Bundesministerium
Land- und Forstwirtschaft,
Klima- und Umweltschutz,
Regionen und Wasserwirtschaft

DaFNE

Nachweis von Bacillus thuringiensis Insektiziden entlang der Österreichischen Gemüse und Obstproduktionskette

Bacillus thuringiensis - 101846

vetmeduni

AGES

Impressum

Projektnehmer:in
Dr. med. vet. Beatrix Stessl
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
1210 Wien

Kooperationspartner:in:
AGES - Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
Institut für Tierernährung und Futtermittel
Spargelfeldstraße 191
1220 Wien

Finanzierungsstelle(n): Bundesministerium Land- und Forstwirtschaft, Regionen und Wasserwirtschaft
Projektlaufzeit: 30.05.2023 – 04.12.2025
1. Auflage
Fotonachweis: Cover: Beatrix Stessl

Wien, 2025. Stand: 28. Oktober 2025

Inhalt

1 Zusammenfassung 5

2 Summary 7

3 Einleitung 9

4 Methoden 16

4.1 Mikro- und molekularbiologische Workflows 16

4.2 Chemisch-analytischer Workflow mittels LC-MS/MS 20

5 Ergebnisse 22

5.1 Etablierung eines mikro- und molekularbiologischen Workflows (Arbeitspaket 1-AP1) 22

5.2 Anwendung eines mikro- und molekularbiologischen Workflows (Arbeitspaket 2 -AP2 und AP3) und Risikoanalyse (AP4) 27

5.2.1 Ergebnisse pBC Feldstudie 27

5.2.2 Ergebnisse Identifizierung pBC Isolate Sekundärproduktion 30

5.2.3 MALDI-Biotyping der Isolate mit Nischenzuordnung und Risikobewertung (Arbeitspaket AP2-AP4) 31

5.2.4 Aussagen für Pathogenität und Nischenzuordnung-Risikogruppe 2 38

5.2.5 Häufige Isolate mit Relevanz für Verderb oder Pflanzenpathogenität in den einzelnen Salaten und Gemüse 39

5.2.6 Subtypisierungsergebnisse für pBC (AP2-AP4) 42

5.2.7 Mikrobiom-Analyse (AP2-AP3) 47

5.2.8 real-time PCR cry2 Gen (Arbeitspaket AP2-AP3) 50

5.3 Etablierung und Anwendung eines chemisch-analytischen Workflows (Arbeitspaket AP1 bis AP3) 51

5.3.1 Optimierung der Probenvorbereitung 51

5.3.2 Untargeted Proteomics 53

5.3.3 Selektion von Markerpeptiden 54

5.3.4 Methodenerstellung und Optimierung 56

5.3.5 Validierung 57

5.3.6 Anwendung der PRM-Methode 61

6 Diskussion 64

Tabellenverzeichnis 68

Abbildungsverzeichnis 69

Literaturverzeichnis 71

Abkürzungen.....76

1 Zusammenfassung

Der Nachweis von Bacillus cereus nach der ISO-Norm 7932 auf MYP-Agar eignet sich nur begrenzt für Gemüse- und Salatprodukte mit hoher natürlicher Hintergrundflora, da er zu falsch-positiven oder -negativen Befunden führen kann. Besonders problematisch ist, dass diese Methode keine Unterscheidung zwischen Biopestizid-stämmigen Bacillus thuringiensis (Bt), wie Bt subsp. kurstaki oder aizawai, und pathogenen B. cereus-Stämmen ermöglicht, die für emetische (Cereulid-bildend) oder enterotoxische (Enterotoxin-bildend) Lebensmittelvergiftungen verantwortlich sind. Da die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) in ihrer aktuellen Biohaz Opinion eine solche Differenzierung für den Einsatz von Biopestiziden ausdrücklich verlangt, wurde im Rahmen dieser Studie ein kombinierter mikro- und molekularbiologischer Diagnostik-Workflow entwickelt. Dieser soll Primärproduzenten dabei unterstützen, die korrekte Dosierung von Biopestiziden zu kontrollieren und gleichzeitig sicherzustellen, dass in der Sekundärproduktion die gesetzlichen Grenzwerte für die B. cereus-Gruppe nicht überschritten werden. Der entwickelte Workflow umfasst mehrere Schritte: Zunächst erfolgt eine mikrobiologische Quantifizierung auf modifiziertem Chromoselect Bacillus Agar, der mit Eigelb und Selektivsupplementen angereichert ist. Anschließend wird eine Ces-PCR durchgeführt, um emetische B. cereus-Stämme auszuschließen, die zwar in Gemüseprodukten selten vorkommen, in stärkehaltigen Lebensmitteln jedoch eine größere Rolle spielen. Eine cry2-spezifische PCR dient der Identifikation von Bt-Biopestizid-Stämmen, während eine RAPD-PCR den genetischen Stammabgleich ermöglicht.

Für erweiterte Analysen kann der Workflow um Enterotoxin-Profiling (Toxinprofil A, Sequenztypen ST8/ST15), ONT-Sequenzierung zur Untersuchung von Evolution und Nischenanpassung sowie Illumina MiSeq zur umfassenden Mikrobiom-Analyse ergänzt werden. Darüber hinaus wurde eine LC-MS/MS-Methode etabliert, die eine qualitative und quantitative Bestimmung von Bt-Kristallproteinen erlaubt. Durch den Einsatz spezifischer Markerpeptide für Bt subsp. kurstaki, aizawai und israelensis sowie stabil-isotopenmarkierter Standards (SIL) erreicht diese Methode Nachweisgrenzen im ppb-Bereich und wurde erfolgreich an kommerziellen Bt-Produkten getestet.

Die Studienresultate zeigen, dass in der Primärproduktion in dieser Studie ausschließlich Bt-Stämme nachweisbar sind, die durch einen Verdrängungseffekt andere präsumptive B. cereus-Stämme unterdrücken. In der Sekundärproduktion bleiben Bt-Stämme zwar

nachweisbar, überschreiten jedoch selten die festgelegten Grenzwerte. Gleichzeitig führt die Zugabe weiterer Rohstoffe in der Gemüse, Salat und Convenience Produktion zu einer erhöhten Diversität nicht-emetischer B. cereus-Stämme (panC-Gruppen II–V), wobei ST26 als besonders persistenter Klon hervorsticht. Bei den Untersuchungen wurden sowohl pflanzenpathogene Bakterien – darunter Chryseobacterium, Pantoea, Erwinia, Pseudomonas und Xanthomonas – als auch Hygieneindikatoren wie Enterococcus, Milchsäurebakterien, Hefen und Schimmelpilze nachgewiesen. Diese Mikroorganismen können Ernteausfälle verursachen, die Lagerfähigkeit der Produkte verkürzen oder die Haltbarkeit deutlich reduzieren. Während die pflanzenpathogenen Bakterien direkt die Gesundheit der Pflanzen beeinträchtigen und zu Fäulnis oder Wachstumsstörungen führen, deuten Hygieneindikatoren oft auf unzureichende Hygienebedingungen während Anbau, Ernte oder Lagerung hin. Beide Gruppen tragen somit maßgeblich zu wirtschaftlichen Verlusten und Qualitätsmängeln bei.Dieser umfassende diagnostische Ansatz verbindet auf effektive Weise praktische Anwendbarkeit mit wissenschaftlicher Präzision und bietet einen robusten Rahmen für eine gezielte Risikobewertung entlang der gesamten Produktionskette. Die Integration dieser fortschrittlichen Methoden bietet Primärproduzenten und Lebensmittelsicherheitsbehörden leistungsstarke Instrumente, um sowohl die Wirksamkeit des Einsatzes von Biopestiziden als auch die Sicherheit von Lebensmitteln in allen Phasen der Produktion zu gewährleisten.

2 Summary

The detection of Bacillus cereus according to ISO 7932 on MYP agar exhibits significant limitations when applied to vegetable and salad products characterized by high natural background flora, frequently yielding false-positive or false-negative results. A critical shortcoming of this method is its inability to differentiate between biopesticidal Bacillus thuringiensis (Bt) strains, including Bt subsp. kurstaki and aizawai, and pathogenic B. cereus strains associated with emetogenic (cereulide-producing) or enterotoxigenic (enterotoxin-producing) food poisoning. In response to the European Food Safety Authority's (EFSA) explicit requirement for such differentiation in biopesticide applications, as outlined in its current Biohaz Opinion, this study developed an integrated micro- and molecular biological diagnostic workflow. This innovative approach supports primary producers in verifying the correct application of biopesticides while ensuring compliance with legal limits for the B. cereus group in secondary production environments.

The established workflow initiates with microbiological quantification on modified Chromoselect Bacillus Agar enriched with egg yolk and selective supplements. Subsequent Ces-PCR analysis serves to exclude emetogenic B. cereus strains, which, though rarely encountered in vegetable products, present a more substantial risk in starchy foods. Cry2-specific PCR is then employed to identify Bt biopesticide strains, while RAPD-PCR enables precise genetic strain matching. For more comprehensive investigations, the workflow can be expanded to include enterotoxin profiling to determine toxin profile A and sequence types ST8/ST15, ONT sequencing for evolutionary and niche adaptation studies, and Illumina MiSeq for in-depth microbiome analysis.

Complementing these methods, an LC-MS/MS technique was developed for the qualitative and quantitative determination of Bt crystal proteins. Utilizing specific marker peptides for Bt subsp. kurstaki, aizawai, and israelensis in conjunction with stable isotope-labeled standards (SIL), this method achieves remarkable sensitivity with detection limits in the ppb range and has been successfully validated using commercial Bt products. Study findings reveal that primary production environments exclusively harbor Bt strains that suppress other presumptive B. cereus strains through a displacement effect. In secondary production settings, while Bt strains remain detectable, they rarely exceed established regulatory limits. However, the introduction of additional raw materials increases the

diversity of non-emetic B. cereus strains, particularly those belonging to panC groups II-V, with ST26 emerging as a notably persistent clone.

The analysis revealed the presence of plant-pathogenic bacteria, including Chryseobacterium, Pantoea, Erwinia, Pseudomonas, and Xanthomonas, as well as indicators of hygiene, such as Enterococcus, lactic acid bacteria, yeasts, and molds. These microorganisms have the capacity to induce crop failure, reduce the shelf life of products, or significantly shorten their shelf life. While plant-pathogenic bacteria directly impact plant health, leading to symptoms such as rot or growth disorders, indicators of hygiene frequently indicate suboptimal conditions during cultivation, harvesting, or storage. Consequently, both groups contribute substantially to economic losses and quality defects. This comprehensive diagnostic approach effectively bridges practical applicability with scientific precision, offering a robust framework for targeted risk assessment throughout the entire production chain. The integration of these advanced methodologies provides primary producers and food safety regulators with powerful tools to ensure both the efficacy of biopesticide applications and the safety of food products across all stages of production.

3 Einleitung

Bacillus thuringiensis (Bt) ist ein grampositives, sporenbildendes Bakterium, das weltweit als biologisches Pestizid in der Landwirtschaft eingesetzt wird. Aufgrund seiner insektiziden Eigenschaften und der geringen ökotoxikologischen Belastung galt Bt lange als sicherer Mikroorganismus für den Einsatz in Lebens- und Futtermitteln (Abbey et al., 2024; Bravo et al., 2011). Bacillus thuringiensis gehört zur Bacillus cereus-Gruppe (auch als B. cereus sensu lato bezeichnet), zu der unter anderem auch Bacillus cereus sensu stricto, Bacillus anthracis, Bacillus thuringiensis, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides und Bacillus weihenstephanensis zählen (Shiekh Suliman et al., 2025). Die traditionelle Einteilung der B. cereus-Gruppe (B. cereus sensu lato) in einzelne Arten wie B. cereus, B. thuringiensis, B. anthracis, B. mycoides, B. pseudomycoides und B. weihenstephanensis wird zunehmend infrage gestellt. Genomische Analysen zeigen, dass diese Arten genetisch so eng verwandt sind, dass eine klare Abgrenzung oft nicht möglich ist. Stattdessen wird die Gruppe nun als Kontinuum von Genomvarianten betrachtet, das sich in verschiedene Biovare (z. B. Biovar Thuringiensis, Biovar Anthracis) unterteilen lässt. Diese zeichnen sich durch spezifische Gene aus, beispielsweise Insektenpathogenitätsgene (Cry) bei B. thuringiensis (Biggel et al., 2022). Nach der Technischen Regel für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA 466) und der EU-Richtlinie 2000/54/EG wird Bacillus thuringiensis in die Risikogruppe 1 (RG 1) eingestuft. Bacillus thuringiensis (Bt) galt lange als nicht humanpathogen und wird weltweit sicher als biologisches Pestizid eingesetzt.

Neuere Bewertungen durch die European Food Safety Authority (EFSA) und der Ausschluss von der Qualified Presumption of Safety (QPS)-Liste zeigen jedoch, dass eine differenziertere Betrachtung der Sicherheit von Bt erforderlich ist. Obwohl Bt weiterhin eine zentrale Rolle in der biologischen Schädlingsbekämpfung spielt, ist eine stammspezifische Risikobewertung nun unverzichtbar. Diese Entwicklung betont die Notwendigkeit einer präzisen Charakterisierung inklusive genomischer Analyse von Bt-Stämmen. Um die Sicherheit und Nachhaltigkeit von Produkten auf Bt-Basis zu gewährleisten, sind die Identifizierung sicherer Stämme und die Entwicklung standardisierter Testverfahren von entscheidender Bedeutung.

In Österreich sind alle zugelassenen Pflanzenschutzmittel, einschließlich Biopestizide, im Pflanzenschutzmittelregister des Bundesamts für Ernährungssicherheit (BAES) gelistet

(https://www.baes.gv.at/zulassung/pflanzenschutzmittel/pflanzenschutzmittelregister) (Abbildung 1).

Handelsbezeichnung	Spezies-Wirkstoff	Anwendung
Bacillus subtilis Gruppe		
Integral Pro, Serifel	Bacillus amyloliquefaciens MBI 600	Ackerbau
Taegro	Bacillus amyloliquefaciens, Stamm FZB24	Ackerbau, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
Serenade ASO, Texio	Bacillus amyloliquefaciens, Stamm QST 713	Ackerbau, Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
Fungisei	Bacillus subtilis IAB/BS03	Gemüsebau
Amylo-X WG	Bacillus velezensis D747	Gemüsebau, Obstbau
Toltek	Bacillus velezensis D748	Ackerbau
Bacillus thuringiensis subsp. Aizawai		
Florbac, Xentari, XenTari, Xentari Buchsbaumzünslerfrei, Xentari Raupenfrei, XenTari WG, Zünsler & Raupenfrei Xentari, Lizetan Raupen- & Zünslerfrei, RaupenEx Schädlingsfrei Careo Eco	Stamm ABTS-1857 und GC-91	Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki		
Bactospeine DF, ES, DiPel DF, ES, Foray 76 B, Lizetan Buchsbaumzünslerfrei, Universal-Raupenfrei Lizetan, Zünsler- & Raupenfrei	Stamm ABTS 351	Gemüsebau, Obstbau, Zierpflanzenbau
Lepinox Plus	Stamm EG 2348	Gemüsebau, Hopfenbau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
Delfin WG	Stamm SA 11	Gemüsebau, Obstbau, Weinbau, Zierpflanzenbau
Bacillus thuringiensis subsp. Israelensis		
Gnatrol SC, Neudomück Pro	Stamm AM65-52	Zierpflanzenbau

Abbildung 1: Überblick der in Österreich zugelassenen Bacillus Biopestizide (https://www.baes.gv.at/zulassung/pflanzenschutzmittel/pflanzenschutzmittelregister; https://www.raiffeisen.com/pflanzenschutzmittel/liste).

In Österreich werden Bacillus thuringiensis (Bt)-Biopestizide im Gemüseanbau zur Bekämpfung von Schädlingen wie z.B. Kohlweißling, Kohleule und Tomatenminiermotte eingesetzt, wobei die Zulassung und Anwendung im biologischen Landbau durch die Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) geregelt wird (AGES, 2023). Die Landwirtschaftskammer Österreich (LWK) empfiehlt Bt-Präparate im Rahmen des integrierten Pflanzenschutzes als umweltfreundliche Alternative zu chemischen Pestiziden (LWK Österreich, 2022), während Bio Austria den Einsatz von Bt im biologischen Gemüseanbau in ihren Richtlinien zum Schädlingsmanagement detailliert beschreibt (Bio Austria, 2021). Bacillus thuringiensis (Bt)-Biopestizide werden in Form von Spritzungen, als Granulate für den Kohl- und Salatanbau sowie als Tonkultur zur präventiven Ausbringung in Gewächshäusern angewendet. Die Anwendungskonzentration von Bt-Präparaten in der Landwirtschaft unterliegt den Zulassungsbedingungen der jeweiligen Produkte. Die typischen Einsatzmengen liegen im Bereich von 8–12 log

koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Hektar, wobei die Menge abhängig ist von der verwendeten Formulierung sowie dem Zielorganismus. Die exakte Konzentration ist dabei abhängig von der zugelassenen Produktvariante sowie den spezifischen Vorgaben der nationalen Zulassung (Kaiser-Alexnat et al., 2012). Für Bacillus thuringiensis als Biopestizid existieren in der EU-Verordnung (EG) Nr. 396/2005 keine spezifischen Rückstandshöchstgehalte (RHG), da Bacillus thuringiensis als Mikroorganismus und nicht als chemisches Pestizid eingestuft wird.

In der Lebensmittelverarbeitung von Gemüse, Obst und Convenience-Produkten stellt der mikrobiologische Nachweis von Bacillus thuringiensis (Bt) innerhalb der Bacillus cereus sensu lato-Gruppe eine erhebliche Herausforderung dar. Da Bt im Routine-Laborverfahren – etwa auf MYP-Agar (Mannitol-Eiergelb-Polymyxin-Agar) – nicht von anderen Vertretern der B. cereus-Gruppe (z. B. B. cereus sensu stricto) unterschieden werden kann, wird es im Rahmen der Quantifizierung als „präsumptiv B. cereus“ (pBC) erfasst (Ehling-Schulz et al., 2019; ISO 7932). Nach den Richt- und Warnwerten der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) werden Lebensmittel wie vorgewaschene Salate, Obst oder Bowls beanstandet, sobald die Keimzahl an präsumptiven B. cereus – zu denen auch Bacillus thuringiensis (Bt) gezählt wird – 10^3 koloniebildende Einheiten (KBE) pro Gramm überschreitet (www.dghm-richt-warnwerte.de/de). Infolgedessen werden sämtliche pBC Kolonien als potenziell risikobehaftet eingestuft, obwohl einige Mitglieder – wie Bacillus thuringiensis (Bt) und Bacillus pseudomycoides – der Risikogruppe 1 angehören und ihre Pathogenität für den Menschen umstritten ist (Carroll et al., 2020).

Die fehlende Spezies-spezifische Bestätigung hat erhebliche ökonomische und operationelle Konsequenzen entlang der Lebensmittelwertschöpfungskette. Es kommt zu deutlichen wirtschaftlichen Verlusten, da Chargen verworfen oder nachbehandelt werden müssen, obwohl sie aus mikrobiologischer Sicht unbedenklich wären. Besonders betroffen sind Betriebe, die biologisch produziertes Gemüse und Obst verarbeiten, da Bt als zugelassenes Biopestizid häufig in der Landwirtschaft eingesetzt wird und somit als Rückstand auf Rohwaren auftreten kann (Abbey et al., 2024; Sanahuja et al., 2011).

Die Standard-Nachweismethoden (ISO 7932) für präsumptive Bacillus cereus (pBC) sind bei Produkten mit hoher natürlicher Keimbelastung, wie wenig prozessierten oder frischen Lebensmitteln mit kurzer Haltbarkeit, in ihrer Aussagekraft deutlich eingeschränkt. Insbesondere die Spezifität leidet unter der starken Begleitflora, die auf Agarplatten, vor allem in niedrigen Verdünnungsstufen, zu dichtem bakteriellem Bewuchs führt. Dadurch kann pBC entweder übersehen werden, wenn die Kolonien atypisch

wachsen oder von schneller wachsenden Begleitkeimen überwuchert werden (falsch-negatives Ergebnis). Gleichzeitig besteht die Gefahr, dass Begleitkeime mit ähnlichen phänotypischen Merkmalen, wie etwa einer positiven Phospholipase-C-Aktivität (Lecithinase-Bildung), fälschlicherweise als pBC identifiziert werden (Fuchs et al., 2022). Diese methodischen Limitationen sind besonders relevant, wenn der Warnwert von 10^3 KBE/g geprüft wird, da hier häufig niedrige Verdünnungsstufen analysiert werden müssen, in denen Begleitkeime dominieren und die Interpretation der Ergebnisse erschweren (https://www.biofocus.de/lebensmittel/mikrobiologie/pathogene-keime/bacillus-cereus). Um eine zuverlässige Identifizierung zu gewährleisten, sind daher molekularbiologische Nachweismethoden unerlässlich, insbesondere der genetische Nachweis spezifischer Toxingene wie ces (Cereulid), hbl (Hämolysin BL) oder nhe (Non-hämolytisches Enterotoxin). Erst durch diese Kombination aus kulturellen und genetischen Analysen lassen sich falsche Zuordnungen vermeiden und eine valide Risikobewertung vornehmen (https://www.bfr.bund.de/lebensmittel-und-futtermittelsicherheit/bewertung-mikrobieller-risiken-von-lebensmitteln/gesundheitliche-bewertung-von-bakterien/bacillus-cereus/; https://www.eurofins.de/lebensmittel/food-news/food-testing-news/nachweis-von-bacillus-cereus/).

In der Herstellungskette von frischem Obst und Gemüse mit kurzer Haltbarkeit ist eine schnelle und zuverlässige Identifizierung von Bacillus cereus (pBC) essenziell – sowohl zur frühzeitigen Erkennung gesundheitlicher Risiken als auch zur Kontrolle der Konzentration von Biopestiziden (z. B. Bacillus thuringiensis) im Rohstoff. Aufgrund der begrenzten Zeitfenster und der hohen natürlichen Keimbelastung sind klassische kulturelle Methoden oft nicht ausreichend. Stattdessen erfordert eine präzise Risikobewertung einen mehrstufigen diagnostischen Ansatz: Zunächst ermöglichen schnelle Screening-Verfahren – wie chromogene Selektivmedien– eine vorläufige Detektion von pBC und die Erkennung kritischer Keimzahlen. Im nächsten Schritt erfolgt eine isolatbasierte Charakterisierung, um stammspezifische Eigenschaften zu erfassen, etwa durch MALDI-TOF-MS. Abschließend liefern molekularbiologische Tools – wie die Bestimmung des ces-Gens (emetisches Toxin), der Enterotoxin-Gene (hbl, nhe, cytK) sowie die panC-Typisierung – eine präzise Gruppenzuordnung. Mithilfe dieser Marker-Gene ist eine Risikoklassifizierung möglich: So sind Stämme der panC-Gruppe III beispielsweise mit einem hohen Risiko für emetische B. cereus assoziiert, während andere Gruppen (z. B. panC-IV) häufiger Umweltstämme mit einem geringen Risiko einer Intoxikation beim Menschen umfassen. Durch die Kombination aus Schnelldiagnostik, Isolat-Analyse und genetischer Typisierung kann nicht nur die Präsenz von pBC nachgewiesen, sondern auch das potenzielle Gefährdungspotenzial (niedrig, mittel oder hoch) abgeleitet werden. Dies bildet die

Grundlage für gezielte Hygienemaßnahmen, Anpassungen im Herstellungsprozess und ein effektives Risikomanagement in der Lebensmittelproduktion.

In Österreich wird sowohl in der Eigenkontrolle der Hersteller als auch in der amtlichen Kontrolle die Referenzmethode nach ISO 7932 (DIN EN ISO 7932:2004) zur Bestimmung von präsumtiven Bacillus cereus (pBC) angewendet. Eine Isolat-Charakterisierung ist dabei nicht Standard (Abbildung 2). Die Bewertung der Produktsicherheit erfolgt gemäß dem Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz (LMSVG, BGBl. I Nr. 13/2006) in der aktuellen Fassung. Dabei ist die Einhaltung des DGHM-Grenzwertes von 10^3 KBE/g in der jeweiligen Produktkategorie entscheidend. Dieser Grenzwert basiert auf den Richt- und Warnwerten der DGHM (2021), die in der Praxis als Bewertungsgrundlage herangezogen werden.

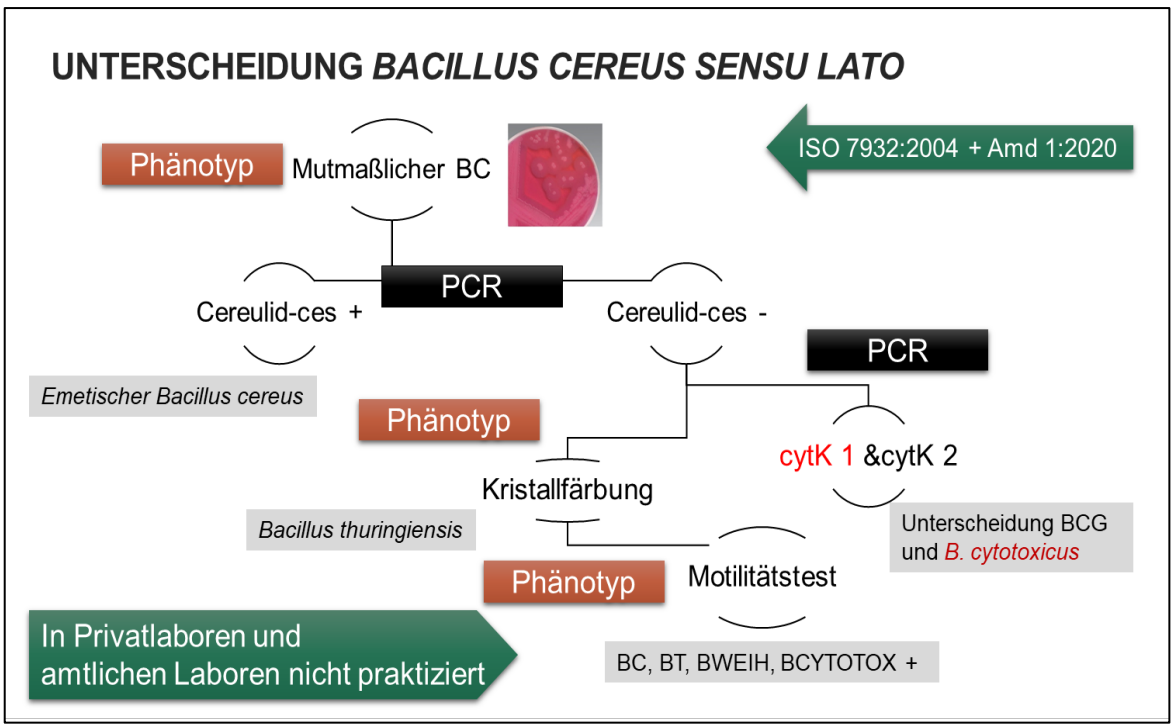

Abbildung 2: pBC Isolat Charakterisierung wie in der ISO 7932 Amendment 2020 vorgesehen.

Labore in Österreich, wie die AGES in Innsbruck oder das Hygienicum in Graz, engagieren sich aktiv für die Weiterentwicklung der pBC-Diagnostik im Rahmen der Eigenkontrolle und kooperieren mit der Vetmeduni Wien in Spezialfragen. Die Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien gilt als universitäre Expertengruppe und wird von Herstellern regelmäßig bei fraglichen pBC-

Isolaten konsultiert. Die Abteilung hat über die Jahre einen spezialisierten Methodenworkflow etabliert, der vor allem molekularbiologische Ansätze umfasst. Dieser Workflow ermöglicht eine präzisere Risikobewertung als die Standardmethode nach ISO 7932. Er unterstützt Hersteller dabei, zwischen harmlosen Umweltstämmen und potenziell pathogenen Bacillus-cereus-Isolaten zu unterscheiden, insbesondere in Fällen, in denen phänotypische Tests (z. B. Lecithinase-Aktivität) keine klare Zuordnung zulassen.

In enger Zusammenarbeit mit der Abteilung für Futtermittelanalyse und Qualitätsprüfung der AGES Wien wird derzeit ein kombinierter Methodenworkflow entwickelt. Dieser umfasst chemisch-analytische Verfahren zum Nachweis von Cry-Proteinen (z. B. aus Bacillus thuringiensis-Biopestiziden). Der Nachweis von Bt-Toxinen (z. B. Cry- Proteine) ist dabei nicht nur für die Qualitätssicherung, sondern auch für die Einhaltung von pBC Grenzwerten in Lebensmitteln relevant. Das Rückstandsspektrum umfasst vorrangig Cry1- und Cry2-Proteine, wobei die genaue Zusammensetzung vom verwendeten Bt-Produkt abhängt.

Der gemeinsame Workflow (mikrobiologisch & molekularbiologisch sowie chemisch-analytisch) soll Herstellern in der Primär- und Sekundärproduktion als standardisiertes Tool zur Verfügung gestellt werden. Damit soll eine zuverlässige Differenzierung von Isolaten und eine optimierte Risikobewertung ermöglicht werden (Abbildung 3).

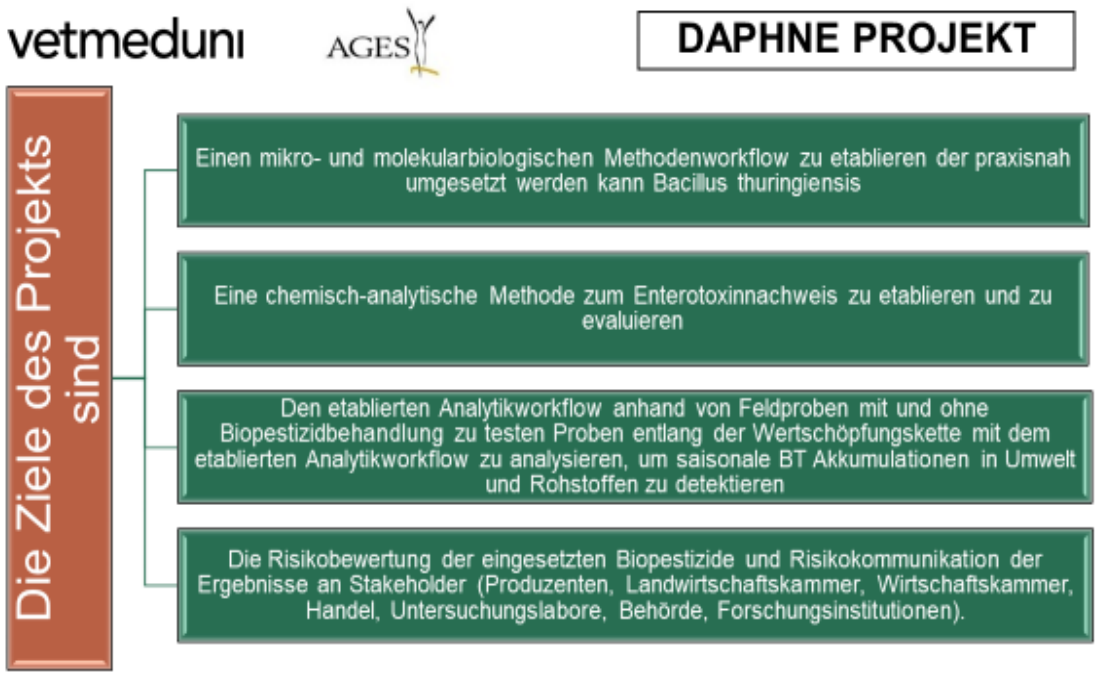

Abbildung 3: Darstellung der Projektziele innerhalb des Projekts.

Die Entwicklung sensitiver Nachweis- und Typisierungsmethoden für pBc und Bt ist aus drei Gründen entscheidend:

- Unterstützung für Landwirt:innen: Präzise Methoden helfen dabei, gesetzliche Vorgaben einzuhalten, indem sie zwischen Bt-Stämmen und B. cereus-Stämmen unterscheiden. So werden Produktverluste vermieden und die Compliance sichergestellt.

- Stärkung der gesellschaftlichen Akzeptanz biologischer Pestizide: Durch zuverlässige Analysen wird deutlich, dass Bt als sicheres Biopestizid eingesetzt wird. Das schafft Vertrauen in biologische Anbaumethoden und reduziert Vorbehalte.

- Sicherheit für Lebensmittelhersteller:innen: Eine genaue Typisierung verhindert, dass Bt-Biopestizide mit B. cereus-Stämmen gleichgesetzt werden, die ein hohes Risiko für Lebensmittelintoxikationen bergen. Gleichzeitig werden pathogene Keime zuverlässig erkannt, wodurch Rückrufe und Produktionsstörungen vermieden werden.

Diese drei Punkte zeigen, wie moderne Nachweismethoden die Landwirtschaft und Lebensmittelhersteller entlasten und effiziente sowie rechtssichere Prozesse ermöglichen (Abbildung 4).

Abbildung 4: Drei Gründe für Die Entwicklung sensitiver Nachweis- und Typisierungsmethoden für pBc und Bt.

4 Methoden

4.1 Mikro- und molekularbiologische Workflows

Der mikro- und molekularbiologische alternative Workflow sieht die Verwendung eines chromogenen Agars zum quantitativen Nachweis von B. cereus präsumtiv vor. Dabei wird die Basis von Chromoselect Bacillus Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) durch die Zugabe von Polymyxin B, optional Trimethoprim und Eigelb selektiver gemacht.

Die quantitativen Daten können für eine erste Risikoabschätzung, aber auch für die Erfolgskontrolle des Biopestizideinsatzes verwendet werden.

Im nächsten Schritt werden typische präsumptive B. cereus Kolonien in ein Isolatset aufgenommen und bei -20°C kryokonserviert. Die DNA-Extraktion erfolgt mit einer Schnellmethode nach Walsh et al. (2013) unter Verwendung von Chelex-Resin (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA), wobei die extrahierte DNA bei -20 °C gelagert werden kann.

Die erste PCR Methode, die zur Abschätzung des Risikos dient ist der Nachweis des ces Gens, welches das emetische Toxin von B. cereus kodiert (Ehling Schulz, 2006; Fuchs et al., 2022). In weiterer Folge wird eine cry-Gen PCR durchgeführt um B. thuringiensis leicht zu identifizieren (Wei et al., 2019) (Abbildung 3).

Falls gewünscht, können nun epidemiologische Fragestellungen vertieft werden. Durch PCR und Sequenzierung des panC-Gens können die Isolate in sieben panC-Gruppen eingeteilt werden (Guinebretière et al., 2010). Eine Online-Software ermöglicht die einfache Eingabe der Sequenzen und die Zuordnung zur panC-Gruppe (https://toolcereusid.shinyapps.io/Bcereus/). Vertreter von B. cereus mit ces-Gen werden der panC-Gruppe III zugeordnet. Im Bereich der Gemüse- und Salatproduktion ist bei B. cereus mit panC Gruppe II und V zu rechnen. Darüber hinaus ist B. mycoides ubiquitär und wird in panC Gruppe VI geclustert. B. thuringiensis, einschließlich der Biopestizid-Stämme, wird in der panC Gruppe IV erwartet. Man kann nun das Toxin Profil der Isolate mittels PCR eruieren. Toxin Profil A bedeutet ein positiver Nachweis der Enterotoxin Gene nhe, hbl und cytK2, dieses wird bei B. thuringiesis Biopestiziden erwartet. Andere häufige

Profile in der Kategorie Gemüse und Obst sind B. cereus panC Gruppe II und V und B. mycoides panC Gruppe V mit den Enterotoxin Profilen C (hbl und nhe) und F (nhe).

Die B. thuringiensis-Isolate werden nun weiter charakterisiert und einer verkürzten 3-Allel-Multi-Locus-Sequenzierung (MLST) unterzogen (https://pubmlst.org/organisms/bacillus-cereus). Hierbei werden die Allele glp, gmk und tpi sequenziert. Das erhaltene Profil kann dann zur Vorhersage der B. thuringiensis-Subspezies verwendet werden. Der ST8 Komplex entspricht B. thuringiensis subsp. aizawai, der ST15 Komplex B. thuringiensis subsp.kurstaki und B. thuringiensis subsp. israeliensis und B. thuringiensis subsp. tenebrionis fallen in den ST23 Komplex. Wenn diese unterschieden werden sollen, ist das vollständige 7-Allel-MLST-Protokoll anzuwenden. Eine weitere Möglichkeit besteht die Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR zur Subtypisierung von B. thuringiensis Subspezies durchzuführen (Bonis et al., 2021). Diese Methode ist innerhalb eines Tages umsetzbar und einfach anzuwenden. Am Ende kann man sich für die Gesamtgenomsequenzierung von einzelnen B. cereus, B. mycoides und B. thuringiensis Stämmen entscheiden, um das Vorkommen und die genetische Anpassung an die Gemüse und Obstproduktionskette genauer zu beleuchten. Dabei werden im Moment zwei Sequenziertechnologien verwendet: Oxford Nanopore Sequenzierung für den Erhalt von Long Reads und Illumina Misq mit kurzen Reads aber einer geringeren Fehlerquote. Illumina- als auch Nanopore-Sequenzierung können in Kombination verwendet werden, was zu einem möglichst umfassenden Einblick in die Genomdaten führt (https://www.microsynth.com/home-de.html) (Abbildung 5).

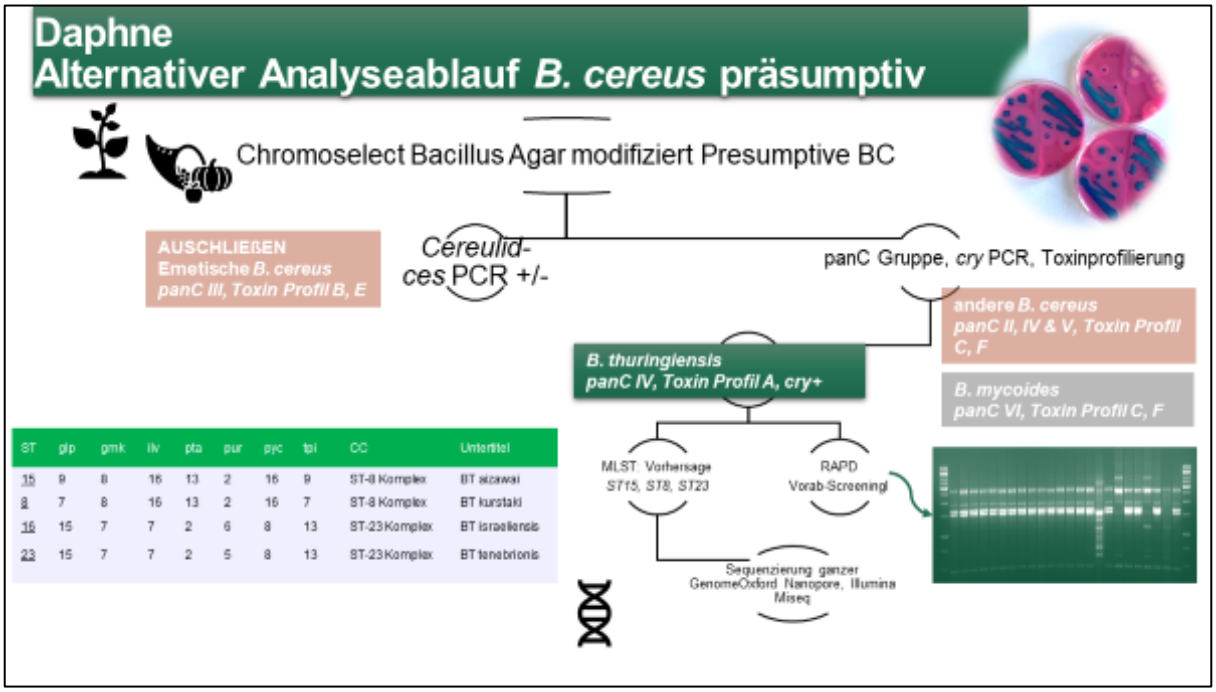

Abbildung 5: Ein alternativer Analyse Workflow für Bacillus cereus präsumtiv und die molekularbiologische Charakterisierung wird dargestellt.

Neben dem selektiven Nachweis von Bacillus cereus ist auch die Quantifizierung und Differenzierung der vorhandenen Mikrobiota von Interesse. Dazu sind in diesem Projekt zwei Ansätze notwendig. Zum einen wird der kulturbasierte Ansatz nach ISO 4833-2 durchgeführt und die mesophile Gesamtkeimzahl bei 30°C quantifiziert. Die Isolate werden mittels 16S-RNA-Sanger Sequenzierung (Fuchs et al., 2022) und Maldi-Biotyping identifiziert. Dieser Methodenvergleich dient der Bewertung der Genauigkeit der Methoden zur Speziesidentifizierung (https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification.html).

Das Isolatmaterial wurde mit einem autoklavierten Zahnstocher in Duplikaten auf die MALDI-TOF-MS-Targetplatte (Bruker Daltonics) aufgetragen. Als interne Positivkontrolle diente der Referenzstamm Listeria monocytogenes BAA 679 (doppelt ausgeführt), während der Bruker Bacterial Test Standard (BTS, Escherichia coli ATCC®) zur Kalibrierung und Ergebnisgenauigkeit eingesetzt wurde. Nach Zugabe von 1 µl 70 %iger Ameisensäure (Merck KGaA) und kurzer Trocknung folgte die Beschichtung mit Alpha-Cyano-4-hydroxyzimtsäure-Matrix, um eine effiziente Co-Kristallisation für den Laserbeschuss zu gewährleisten.

Die Messung wurde mit der Software MBT Compass 4.1 (Bruker Daltonics) gesteuert, wobei jede Probe eine eindeutige Nummer erhielt. Nach Laserionisation und Trennung der Ionen im Time-of-Flight-Analysator (TOF) erfolgte der Abgleich der Massenspektren mit Referenzdatenbanken. Nur übereinstimmende Duplikate wurden für die Auswertung berücksichtigt.

Beim nicht-Kultur-basierten Ansatz wird die DNA nach Verwendung des Probenvorbereitungsprotokolls (Homogenisierung und Konzentrierung durch Zentrifugation) mit dem Nucleospin Tissue Kit (Machery Nagel, VWR International, Radnor USA) extrahiert. Diese DNA ist hochrein, messbar (Qubit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und kann für den entwickelten quantitativen PCR-Assay mit Target Gen cry zur Quantifizierung des B. thuringiensis Crystal-Protein-Gens verwendet werden (Wei et al., 2019, modifiziert). Anschließend kann die Sequenzierung des Mikrobioms mittels Illumina Miseq 16 S-Amplicon-Sequenzierung durchgeführt werden, um die hoch abundanten bakteriellen Phyla und Genera in den Proben abzuschätzen. Als positiver Nebeneffekt kann mit dieser Analytik der Erfolg des Biopestizideinsatzes in der Primärproduktion abgeschätzt und die Mikrobiota neben der B. cereus-Gruppe identifiziert werden, die möglicherweise Pflanzen spezifisch sind und einen Aufschluss über z.B. Verderb zulassen (Abbildung 6).

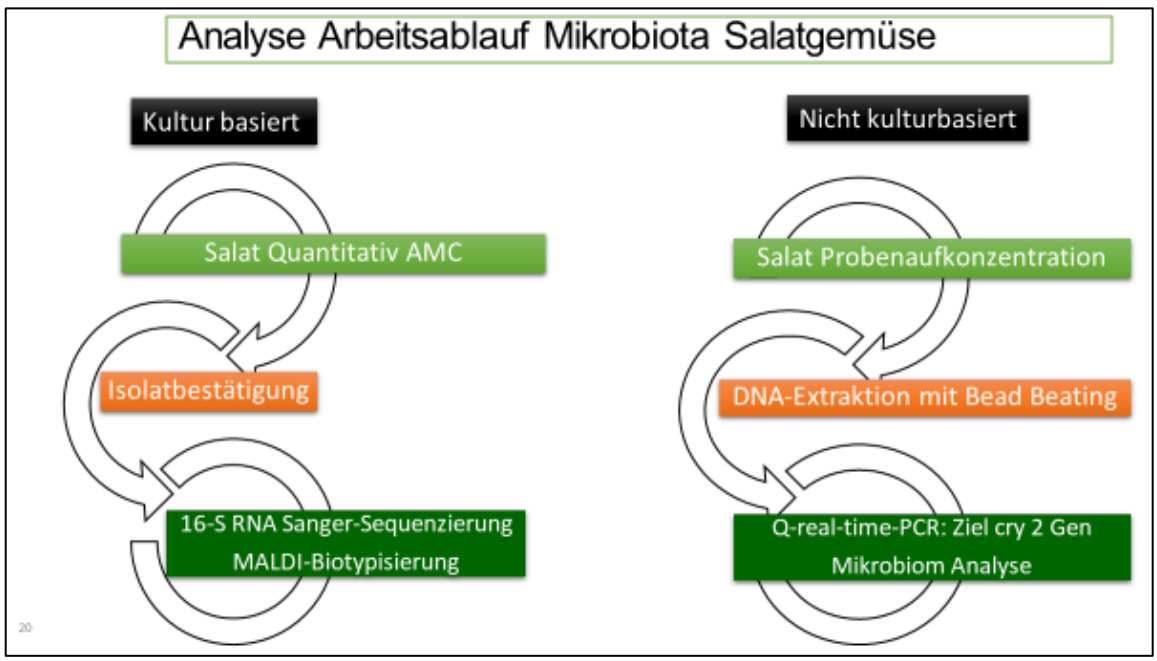

Abbildung 6: Kultur- und nicht Kultur basierter Analyse Workflow zur Bestimmung der Mikrobiota und Quantifizierung des cry Gens im Gemüse.

4.2 Chemisch-analytischer Workflow mittels LC-MS/MS

Zur Analyse der Kristallproteine wurde eine Targeted-LC-MS/MS-Methode entwickelt. Aufgrund ihrer Größe sind Proteine schlecht detektierbar, da sie sich nur schwer ionisieren lassen. Daher werden sie durch spezifische Enzyme in kleinere Peptide gespalten. Diese weisen eine bessere Ionisierbarkeit auf und können mit deutlich gesteigerter Empfindlichkeit erfasst werden. Typischerweise wird das modifizierte Enzym Trypsin verwendet, welches die Aminosäuresequenz der Proteine spezifisch nach Lysin und Arginin spaltet. Die Generierung hochspezifischer Peptide ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen mittels Datenbanken in Kombination mit spezifischen Bioinformatik-Softwaretools. Die Entwicklung einer targeted Methode basiert auf der Identifizierung spezifischer Markerpeptide. Die Entwicklung der targeted Methode erfolgt in drei Schritten. Zunächst werden Proteine als Ziel-Analyten identifiziert, anschließend werden geeignete Peptide für die Proteine selektiert und schließlich wird die Methode kreiert und optimiert. Um die Ziel-Analyten zu identifizieren und geeignete Peptide zu selektieren, werden untargeted Verfahren, auch als "Discovery Proteomics" bezeichnet, eingesetzt. Es existieren zwei verschiedene Messprinzipien: die data-dependent acquisition (DDA) und die data-independent acquisition (DIA). Die Kombination dieser beiden Messmethoden erlaubt die Erfassung einer möglichst großen Anzahl unterschiedlicher Peptide. Die gewählten Peptide müssen selektiv, stabil und möglichst abundant sein, um eine sensitive Methode entwickeln zu können. Im finalen Schritt des Verfahrens werden unter Verwendung einer Software (Skyline, MassLynx) die ausgewählten Markerpeptide verwendet, um die Targeted-Methode zu erstellen und die Messparameter zu optimieren. Darüber hinaus wurde die Probenvorbereitung hinsichtlich der Auswahl des Extraktionsmittels und der Aufkonzentrierung der Ziel-Proteine optimiert. Im Rahmen der Untersuchung wurden zwei Extraktionsmittel und drei Strategien zur Proteinanreicherung miteinander verglichen. Zur enzymatischen Verdauung sowie zur Aufreinigung der entstandenen Peptide wurde ein klassisches Proteomics-Protokoll nach Geislitz et al. (2022) adaptiert.

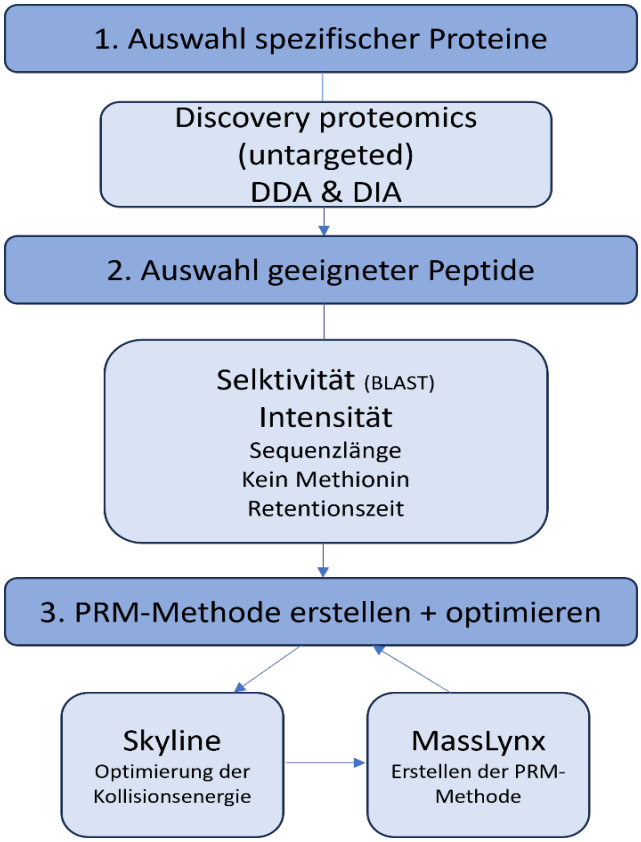

Abbildung 7: Proteomics-Workflow für Etablierung einer targeted Methode zur Analyse von Kristall-Toxinen mittels hochauflösender LC-MS/MS

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung eines mikro- und molekularbiologischen Workflows (Arbeitspaket 1-AP1)

In den ersten Schritten der Etablierung des molekularbiologischen Workflows (Abbildung 8) wurde die PCR Kombination zur Differenzierung von pBC und BT getestet. Dabei stand ein Isolatset von Rohstoffen und Endprodukten (ready-to eat-RTE) zweier Produzenten zur Verfügung (Unternehmer A und B) (Abbildung 9).

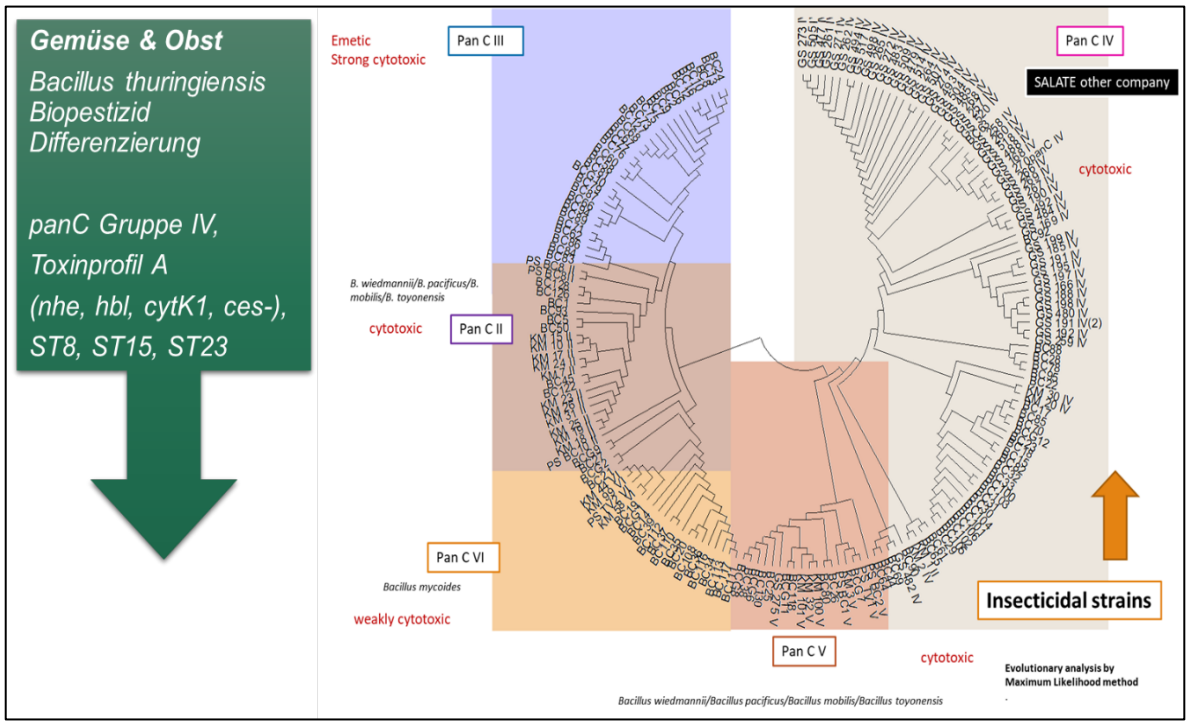

Abbildung 8: Molekularbiologische Charakterisierung zur Differenzierung von pBC und BT mit Sequenziermethoden und Toxin-Profiling.

In Abbildung 9 und 10 sieht man die Differenzierungsmöglichkeit eines pBC Isolatsets (n=117) mit der Kombination der PCRs cry2, Toxin-Profiling und panC Sequenzierung.

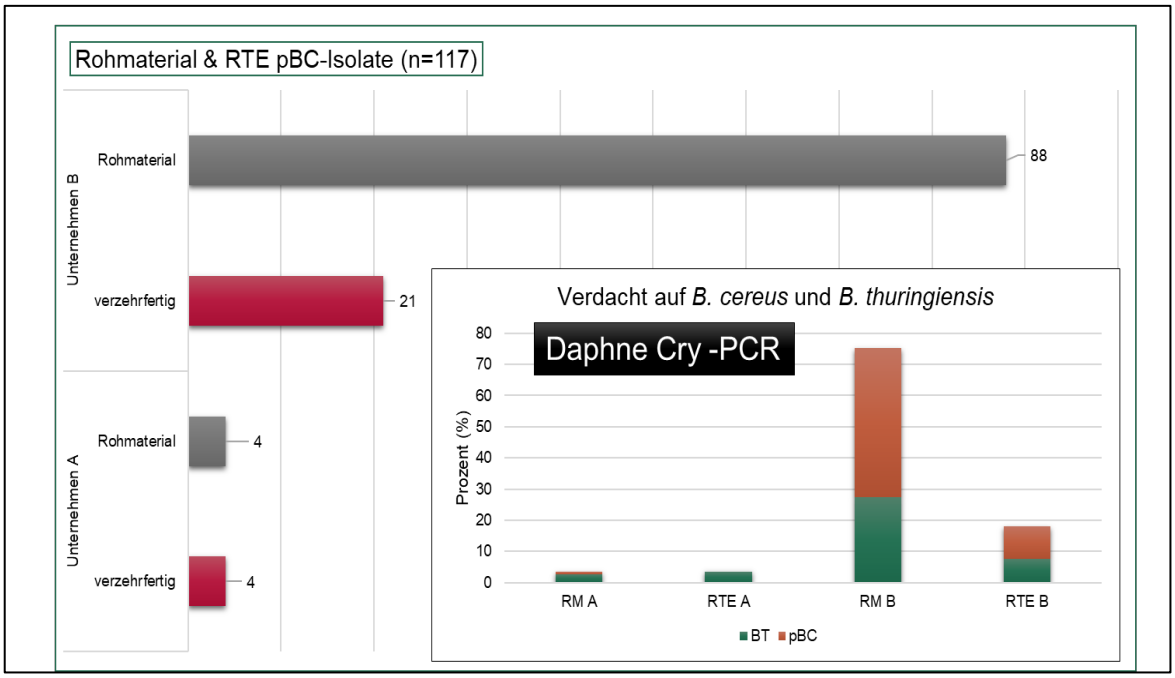

Abbildung 9: Differenzierung von pBC und BT mit der cyr2 PCR anhand eines pBC Isolatset zweier Hersteller.

BT Stämme die 100% im cry2 Gen positiv sind werden sowohl im Rohmaterial (verschiedene Salate) als auch Endprodukt (vorgewaschene Salate-RTE) wiedergefunden. Während der Herstellung kommt es zu einer Wiederfindung auch bei pBC (hier B. cereus, B. mycoides) (Abbildung 9).

BT Stämme werden immer in der panC Gruppe IV und mit dem Toxin Profil A wiedergefunden (ces negativ, nhe positiv, hbl positiv, cytK2 positiv) (Abbildung 10).

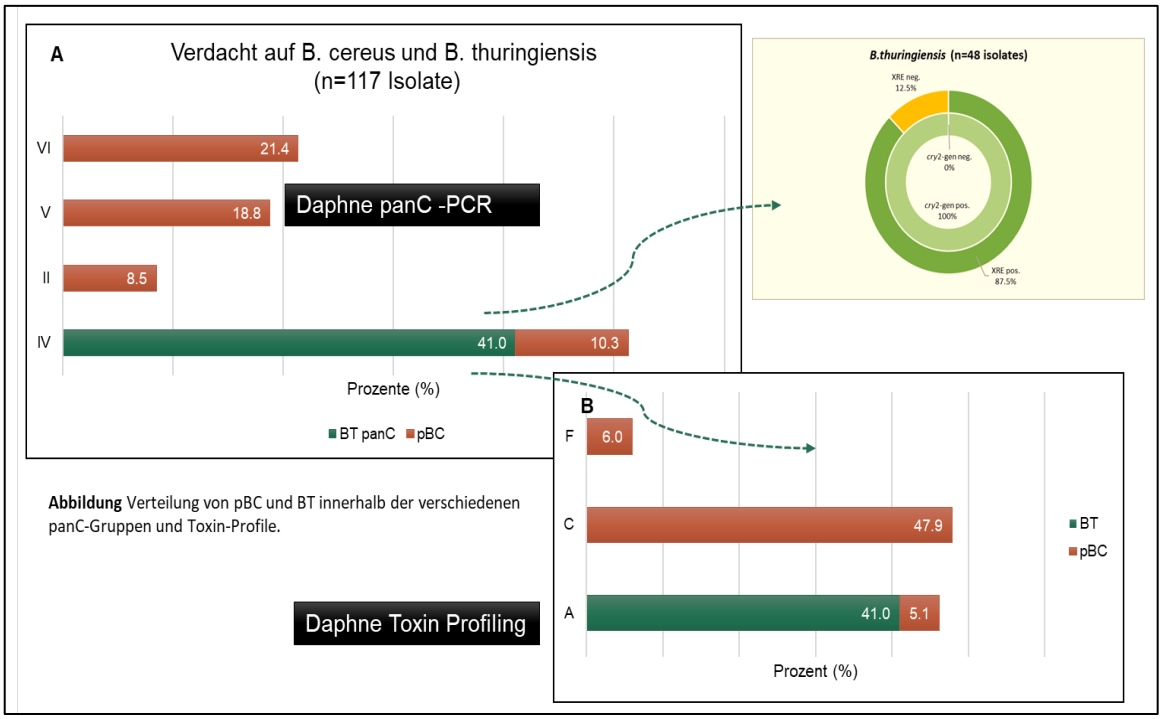

Abbildung 10: Differenzierung von pBC und BT mit der panC PCR und dem Toxin Profiling anhand eines pBC Isolatset zweier Hersteller.

Im nächsten Schritt wurde ein repräsentatives Isolat-Panel zusammengestellt, das Referenzstämme der DSMZ, Feldisolate sowie Isolate aus Biopestiziden umfasst. Dieses Panel diente als Grundlage, um die relevanten Charakteristika für die Evaluierung der nachfolgenden methodischen Schritte systematisch zu erfassen.

Um eine hochqualitative Long-Read-Sequenzierung mit der Oxford-Nanopore-Technologie (ONT) zu ermöglichen, wurde in Zusammenarbeit mit der Microsynth AG zunächst eine angepasste Probenvorbereitungs- und Versandmethode entwickelt. Nur so konnte sichergestellt werden, dass die generierten Long-Read-Daten eine ausreichende Qualität für die Auswertung aufwiesen. Dieser Schritt war entscheidend, um zuverlässige und aussagekräftige Sequenzdaten für die weitere Analyse zu erhalten. Dabei wurden die Stämme angezüchtet (mindestens 8 log KbE/ml) und ein Bakterienpellet erzeugt, dass dann zum Versandt in einem Puffersystem entwickelt von Microsynth AG zur Verfügung stand. Die DNA-Extraktion für die Oxford-Nanopore-Sequenzierung (ONT) ist besonders anspruchsvoll, da bereits kleine Fehler – wie ein zu starkes Zentrifugieren der Bakteriensuspension oder der extrahierten DNA – die Integrität der hochmolekularen DNA beeinträchtigen können. Da ONT auf lange, intakte DNA-Fragmente angewiesen ist, können mechanische Schäden während der Extraktion zu Fragmentierung, verringerter Read-Länge oder sogar Ausfall der Sequenzierung führen. Eine sorgfältige Handhabung

und optimierte Protokolle sind daher entscheidend, um hochqualitative Long-Read-Daten zu gewährleisten (https://www.microsynth.com/nanopore_sequencing/yeast-genome-sequencing.html). Die Genome stehen nun zum Abgleich für Folgestudien zur Verfügung.

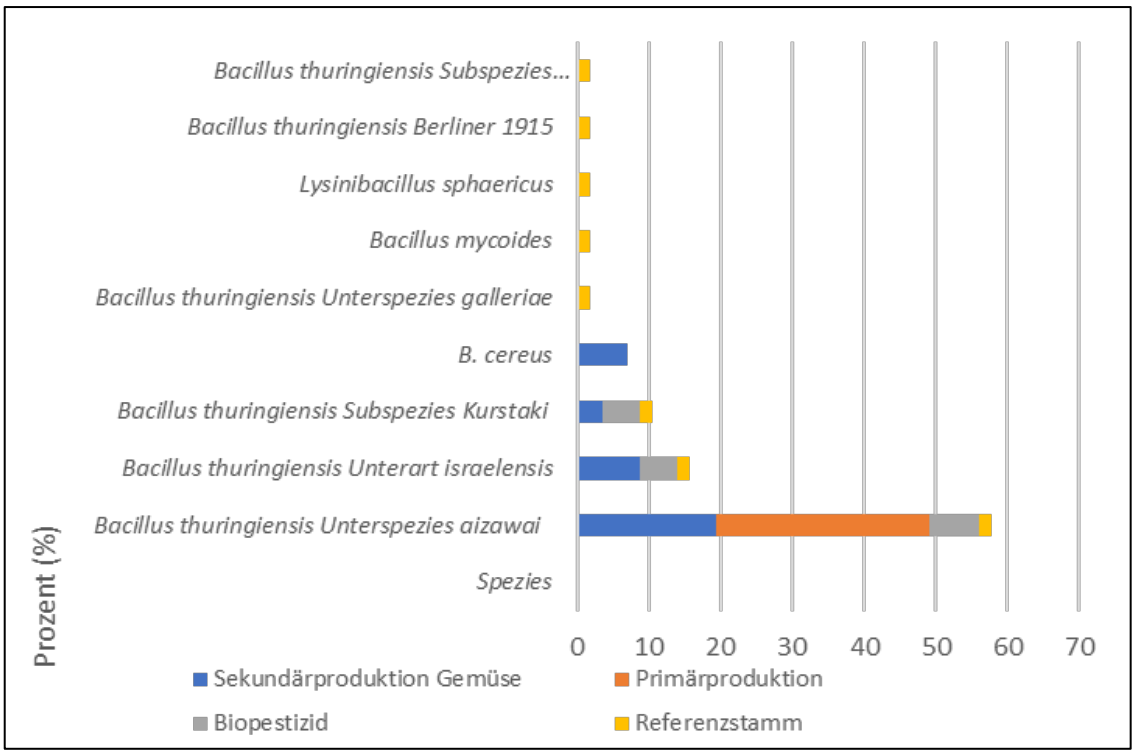

Abbildung 11: pBC Isolat Test Panel für die Methodenbewertung (n=57).

Die molekularbiologische Charakterisierung des Isolat-Test Panels (Abbildung 11) zeigt folgende zentrale Ergebnisse:

Der Nachweis des cry2-Gens gelang zuverlässig bei Bacillus thuringiensis subsp. aizawai und B. thuringiensis subsp. kurstaki (Abbildung 11). Bacillus thuringiensis subsp. aizawai ist der häufigste Vertreter im Testpanel. Das verwendete Stammset zur Identifizierung der Biopestizide besteht ausschließlich (100 %) aus Vertretern der panC-Gruppe IV, mit Ausnahme der Outgroup, die durch einen Lysinibacillus-Stamm repräsentiert wird. Auffällig ist, dass ein DSMZ-Referenzstamm von B. mycoides nicht – wie erwartet – der panC-Gruppe VI zugeordnet werden konnte.

Die Cereulid-Bildung (ces-Gen) wurde bei keinem der Isolate (0 %) nachgewiesen, was bestätigt, dass emetische B. cereus-Stämme der panC-Gruppe III in diesem Stammset nicht vertreten sind. Die Verteilung der Toxin-Profile zeigt, dass 89 % der Isolate dem

Toxin-Profil A angehören, gefolgt von 7 % mit Toxin-Profil C (exklusiv B. thuringiensis subsp. israeliensis) und einem Einzelisolat mit Toxin-Profil G (Abbildung 9).

Die MLST-Analyse (Multi-Locus Sequence Typing), selbst auf Basis eines reduzierten 3-Allel-Typings, ermöglicht eine klare Zuordnung der Isolate zu bekannten Sequenztyp (ST)-Komplexen:

B. thuringiensis subsp. aizawai: 100 % dem ST15-Komplex zugehörig,

B. thuringiensis subsp. kurstaki: 100 % dem ST8-Komplex zugehörig,

B. thuringiensis subsp. israeliensis: 100 % dem ST23-Komplex zugehörig. Andere B. cereus-Isolate mit Toxin-Profil A verteilen sich dagegen auf verschiedene ST-Komplexe (ST18, ST97 und ST111).

Die RAPD-Profile (Random Amplified Polymorphic DNA) nach M13-PCR zeigen eine hohe Uniformität innerhalb der Biopestizid-Isolate und Feldisolate von B. thuringiensis subsp. aizawai und B. thuringiensis subsp. kurstaki (Abbildung 12). Im Gegensatz dazu weist die B. cereus-Gruppe eine deutlich höhere genetische Diversität auf. Bei B. thuringiensis subsp. israeliensis stimmen die RAPD-Profile der Biopestizid-Isolate, des DSMZ-Referenzstamms und eines Feldisolats überein, was auf eine enge Verwandtschaft dieser Stämme hindeutet. Die gel-basierte Elektrophorese für die RAPD-PCR wurde durch eine Kapillarelektrophorese (Qiaxel, Qiagen) ergänzt. Diese Anpassung reduziert Artefakte und ermöglicht eine präzisere und reproduzierbarere Auftrennung der Amplifikate.

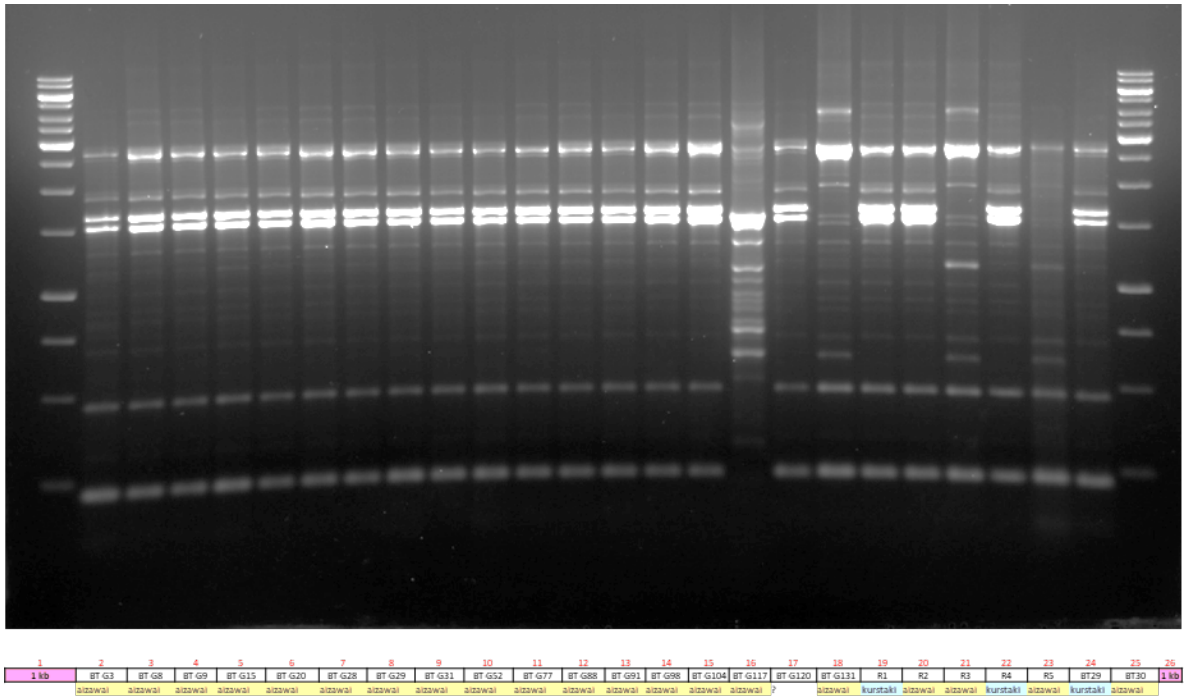

Abbildung 12: Beispielbild für eine RAPD PCR von pBC Isolaten. Das dominanten RAPD Profil ist links im Bild B. thuringiensis subsp. aizawai.

5.2 Anwendung eines mikro- und molekularbiologischen Workflows (Arbeitspaket 2 -AP2 und AP3) und Risikoanalyse (AP4)

5.2.1 Ergebnisse pBC Feldstudie

In der Feldstudie wurden zwei Probengruppen untersucht: Feldproben der LGV (n = 30) sowie Handelsproben (n = 106). Die Feldproben der LGV wurden unter realen Praxisbedingungen gewonnen, wobei die Bacillus thuringiensis subsp. aizawai-Produkte Florbac, Xentari und Serenade saisonal und durch Spritzapplikation von den Landwirt:innen ausgebracht wurden. Die Applikation erfolgte dabei zeitlich begrenzt während der vegetativen Phase, um den Einsatz der Biopestizide unter typischen Anbaubedingungen abzubilden. Für Biopestizide auf Basis von Bacillus thuringiensis (Bt), wie Florbac, Xentari oder Serenade, gelten in der Regel sehr kurze Wartezeiten (Pre-Harvest Interval, PHI) vor der Ernte. Je nach Produkt und Kultur beträgt die Wartezeit meist 0 bis 3 Tage. Beispielsweise darf Florbac (B. thuringiensis var. aizawai) bei Kulturen wie Kohl oder Salat oft bis 1 Tag vor der Ernte ausgebracht werden, während Xentari je nach Anwendung 0 bis 3 Tage Wartezeit erfordert. Serenade (Bacillus subtilis) ist in vielen Fällen ohne Wartezeit (0 Tage) einsetzbar.

Die genauen Wartezeiten sind jedoch produkt- und kulturspezifisch und müssen den Angaben auf dem Etikett oder den amtlichen Zulassungsbedingungen (z. B. über die AGES oder das BASG) entnommen werden. Zudem ist zu beachten, dass in ökologischen Anbausystemen (z. B. Bio Austria) teilweise strengere Vorgaben gelten können. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die Applikation nicht während der Blüte erfolgen sollte, um Bienen und andere Bestäuber zu schützen.

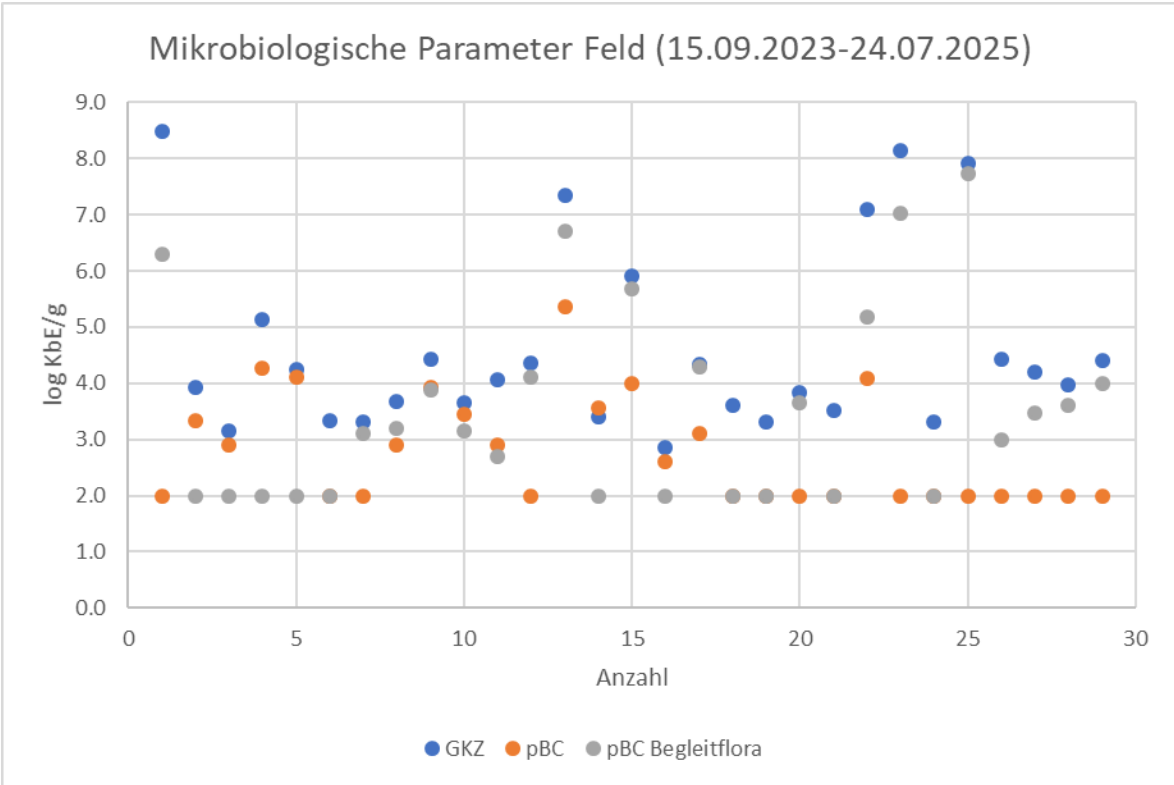

Abbildung 13: Mikrobiologische Parameter (Gesamtkeimzahl, pBC, pBC Begleitflora; log KbE/g) der LGV Feldproben im zeitlichen Verlauf.

Die Keimzahlen der Bacillus cereus-Gruppe (pBC) in den untersuchten Feldproben variierten zwischen nachweisbar (2 log KbE/g) und 5,35 log KbE/g, wobei der Mittelwert bei 2,86 log KbE/g lag. In 10 von 29 Proben (34 %) wurden geringe Konzentrationen unter 100 KbE/g (2 log KbE/g) gemessen, während 10 Proben (34 %) den Grenzwert von 3 log KbE/g überschritten – insbesondere bei Tomaten, Paprika, Pak Choi, Melanzani, Gurken sowie Gurken- und Zucchiniblättern. Der höchste Wert (5,35 log KbE/g) wurde dabei in Pak Choi nachgewiesen. In 9 Proben (31 %) lagen die pBC-Werte an der Nachweisgrenze von 2 log KbE/g (Abbildung 13).

Diese Ergebnisse wurden an die LGV weitergeleitet und dienen als Grundlage zur Optimierung der Applikation von Biopestiziden, um eine zielgenauere und sicherere Anwendung zu gewährleisten.

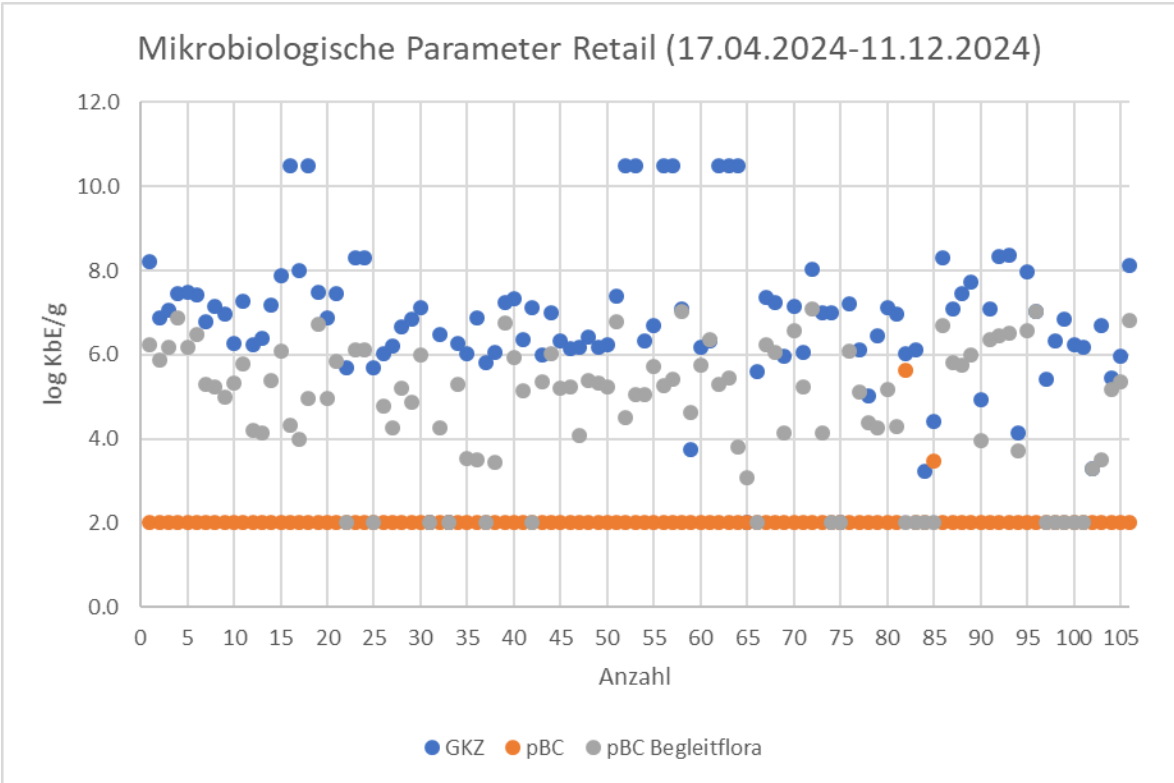

Abbildung 14: Mikrobiologische Parameter (Gesamtkeimzahl, pBC, pBC Begleitflora, log KbE/g) der Handelsproben (Retail) im zeitlichen Verlauf.

In den Handelsproben war die Bacillus cereus-Gruppe (pBC) meist nur an der Nachweisgrenze nachweisbar. Lediglich zwei Ausreißer-Proben überschritten den Grenzwert von 3 log KbE/g: eine Gurkenprobe aus Griechenland (5,63 log KbE/g) und eine Zucchiniprobe aus Spanien (3,46 log KbE/g) (Abbildung 14).

Die Gesamtkeimzahl der untersuchten vorgewaschenen Salate und Gemüseproben (gemäß DGHM-Richtwert) wurde bei einigen Proben überschritten (n=46/106; 43.4%) und lag im Bereich von 2,00 bis 10,48 log KbE/g, mit einem durchschnittlichen Wert von 6,78 log KbE. Der Richtwert der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) für die Gesamtkeimzahl bei vorgewaschenen, verzehrfertigen Salaten und Gemüse liegt bei maximal 7 log KbE/g. Dieser Wert gilt als Empfehlung für die hygienisch-mikrobiologische Qualität und dient als Orientierung für die Beurteilung der Produktqualität. Überschreitungen können auf mangelnde Hygiene bei Herstellung,

Verarbeitung oder Lagerung hinweisen. Die festgestellte Grenzwertüberschreitung der Gesamtkeimzahl ist nicht auf die pBC-Gruppe zurückzuführen. Im Folgenden (5.2.2.) werden die relevanten Keimgruppen innerhalb der dominierenden Bakterienphyla analysiert, die ein pflanzenpathogenes Potenzial aufweisen oder mikrobiellen Verderb des Produkts begünstigen können.

5.2.2 Ergebnisse Identifizierung pBC Isolate Sekundärproduktion

Dankenswerterweise stellte ein Sekundärproduzent Proben aus seinem Eigenkontrolllabor zur Verfügung, die im Rahmen der Routineuntersuchungen den pBC-Grenzwert überschritten hatten. Die durchgeführte Diagnostik mittels MALDI-BIotyping der Isolate auf BACARA-Agar und Blutagar ergab, dass 60 % der Isolate tatsächlich der Bacillus cereus-Gruppe (pBC) zuzuordnen waren, während 40 % zur Begleitflora gehörten (Abbildung 15). Dieses Ergebnis zeigt, dass bei Proben mit hoher Grundkeimzahl die Selektivität der Agarplatten abnimmt, was zu falsch-positiven Befunden führen kann. Demnach enthielt ein nicht unerheblicher Anteil der als pBC-positiv bewerteten Proben keine echten pBC-Stämme. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit zusätzlicher Bestätigungstests – insbesondere bei stark kontaminierten Proben – um eine zuverlässige Differenzierung zu gewährleisten und die Aussagekraft der Routinediagnostik zu erhöhen.

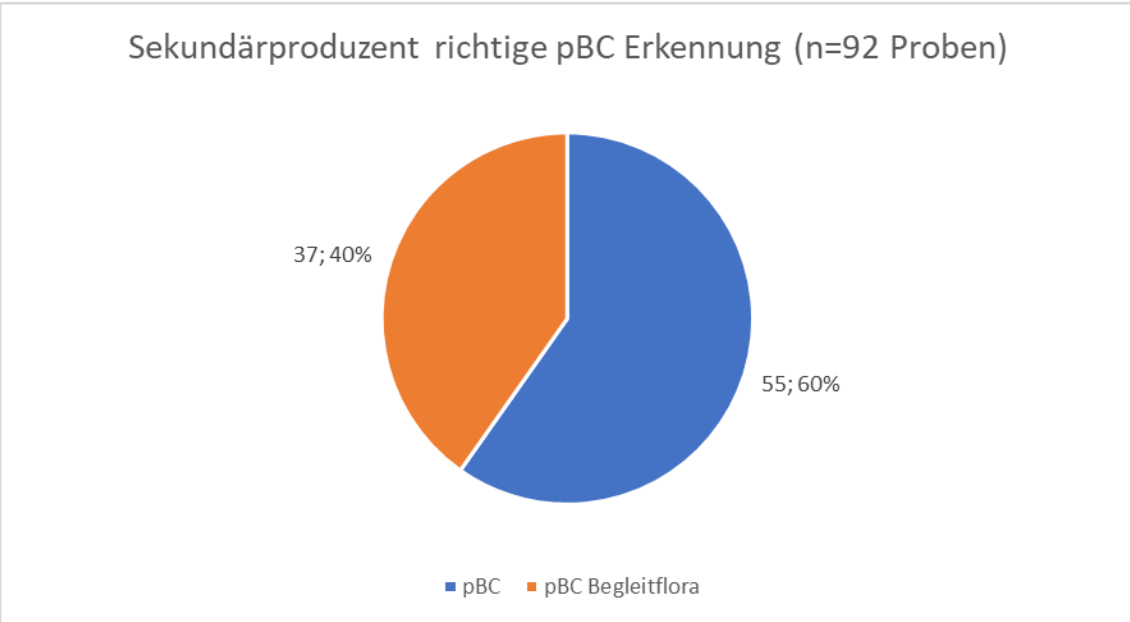

Abbildung 15: MALDI-Biotyping Bestätigung von pBC im Rahmen der Eigenkontrolle.

Die in unserer Diagnostik untersuchten Isolate wurden erfolgreich mittels MALDI-Biotyping bestätigt und stehen nun als Referenzset für zukünftige Methodenvergleiche zur

Verfügung. Dieses Referenzset wird den Eigenkontrolllaboren der AGES Innsbruck und des Hygienicums Graz sowie der internen Eigenkontrolle von Primär- und Sekundärproduzenten bereitgestellt. Die pBC-Isolate wurden außerdem im Rahmen des Projekts mit dem alternativen Workflow subtypisiert (panC, RAPD, Toxin-Profil) und zusätzlich einer Gesamtgenomsequenzierung (WGS) unterzogen. Dadurch wird eine präzise Charakterisierung der Stämme ermöglicht, die eine hohe Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet und die Grundlage für eine zuverlässige Risikobewertung bildet.

5.2.3 MALDI-Biotyping der Isolate mit Nischenzuordnung und Risikobewertung (Arbeitspaket AP2-AP4)

Im Rahmen des Projekts stand ein umfassendes Isolatset (n = 1.125) zur Verfügung, das 168 verschiedene Bakterienspezies (Abbildung 16 bis 21) sowie einen Pilz (Moesziomyces aphidis) umfasste. Sämtliche Isolate wurden mittels MALDI-Biotyping bestätigt und einer Risikobewertung nach der Technischen Regel für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) unterzogen, um ihr potenzielles Gefahrenpotenzial systematisch einzuschätzen. Darüber hinaus erfolgte eine Nischenzuordnung mithilfe des MicrobeAtlas, wodurch die Isolate ihren ursprünglichen Habitaten (z. B. Wasser, Erde, Tier oder Pflanze) zugeordnet werden konnten. Diese kombinierte Analyse ermöglichte eine zielgerichtete Identifikation und Bewertung von Kontaminationsquellen, insbesondere durch Verderbserreger oder Pflanzenpathogene, und lieferte damit wertvolle Erkenntnisse für die mikrobiologische Risikobewertung und Qualitätskontrolle (https://bacdive.dsmz.de/; https://microbeatlas.org/landing; https://www.baua.de/DE/Angebote/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html).

Das Isolatset ermöglicht tiefere Einblicke in potenzielle pflanzenpathogene Mikroorganismen, die als Grundlage für zielgerichtete Präventionsmaßnahmen im landwirtschaftlichen Anbau genutzt werden können. Durch die Identifikation und Charakterisierung von Pathogenen können spezifische Kontrollstrategien (z. B. resistente Sorten, biologische Antagonisten oder gezielte Hygienemaßnahmen) entwickelt werden, um Ernteausfälle zu minimieren und die Nachhaltigkeit der Produktion zu verbessern.

Moesziomyces aphidis, der auf gelben Paprikaproben (Feldproben) isoliert wurde, ist ein pflanzenassoziierter, hefeartiger Pilz. Er wurde ursprünglich als Pflanzenpathogen beschrieben, beispielsweise als Verursacher von Fruchtflecken, gehört der Risikogruppe 1 an und hat auch antifungale Wirkung gegen Schadpilze wie Echten Mehltau (https://imafungus.biomedcentral.com/articles/10.5598/imafungus.2017.08.01.09).

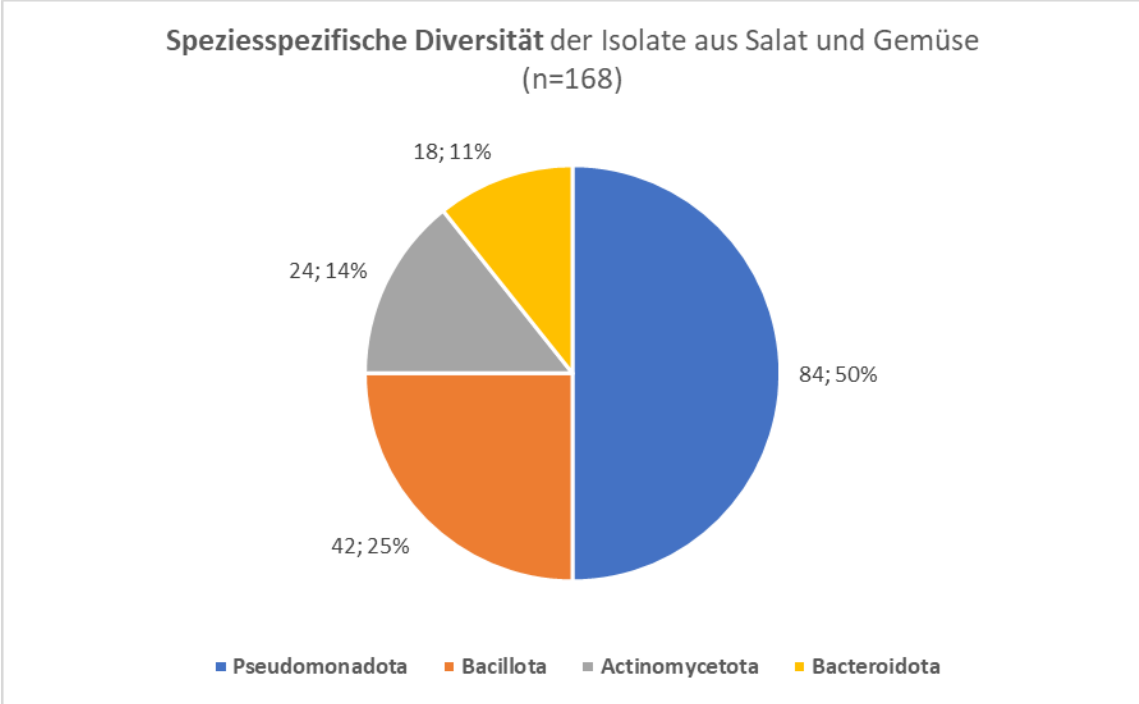

Abbildung 16: Bakterielle Spezies Diversität in den 4 dominierenden Phyla bei Isolaten aus Salat und Gemüse.

Phylum	Familie	Organismus	aquatic (%)	plant (%)	soil (%)	animal (%)	Risk group
Actinomycetota	Micrococcaceae	Rothia endophytica	1.4	0.4	1.0	62.6	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Micrococcus luteus	10.2	3.3	6.4	39.8	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Glutamicibacter soli	7.0	1.3	6.3	35.9	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Kocuria rosea	6.3	8.4	10.7	35.6	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Glutamicibacter protophormiae	0.9	3.5	28.4	33.6	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Glutamicibacter arilaitensis	9.6	4.5	6.0	32.8	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Glutamicibacter mysorens	11.9	3.7	10.7	25.8	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Curtobacterium flaccumfaciens	7.3	10.4	11.9	22.8	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Paenarthrobacter aurescens	4.7	11.8	19.7	21.4	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Arthrobacter psychrolactophilus	10.0	5.9	21.9	19.1	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Paenarthrobacter ilicis	2.6	7.2	29.0	16.9	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Paenarthrobacter nicotinovorans	2.6	7.2	29.0	16.9	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Pseudarthrobacter chlorophenolicus	4.1	7.2	26.5	14.6	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Pseudarthrobacter oxydans	4.1	16.4	30.7	5.8	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Pseudarthrobacter polychromogenes	4.1	16.4	30.7	5.8	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Pseudarthrobacter scleromae	4.1	16.4	30.7	5.8	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Pseudarthrobacter sulfonivorans	4.1	16.4	30.7	5.8	1
Actinomycetota	Micrococcaceae	Paenarthrobacter ureafaciens	6.0	11.0	16.5	5.7	1
Actinomycetota	Microbacteriaceae	Microbacterium arborescens	6.1	1.8	16.0	33.4	1
Actinomycetota	Microbacteriaceae	Microbacterium foliorum	9.2	6.4	12.6	27.6	1
Actinomycetota	Microbacteriaceae	Microbacterium phyllosphaerae	9.2	6.4	12.6	27.6	1
Actinomycetota	Microbacteriaceae	Microbacterium barkeri	15.3	2.9	8.6	25.9	1
Actinomycetota	Microbacteriaceae	Microbacterium maritypicum	13.0	7.6	13.8	23.1	1
Actinomycetota	Nocardiaceae	Rhodococcus erythropolis	13.1	5.7	15.7	23.5	1

Abbildung 17: Bakterielle Spezies des Phylums Actinomycetota – Isolierung, Nischenzuordnung und Risikobewertung.

Wichtige Aussagen für Gemüse und Verderb (Abbildung 16):

Curtobacterium flaccumfaciens ist der einzige bekannte Pflanzenpathogen in dieser Gruppe und direkt relevant für Gemüse. Im Gegensatz dazu können Rhodococcus erythropolis und einige Microbacterium-Arten indirekt an Verderbsprozessen beteiligt sein, beispielsweise durch Enzymproduktion oder Sekundärinfektionen. Die meisten anderen Arten, wie Rothia endophytica, Micrococcus luteus und verschiedene Glutamicibacter-Arten, sind nicht primär mit Gemüseverderb assoziiert. Stattdessen kommen sie häufig in Boden oder auf Pflanzenoberflächen vor und spielen oft eine Rolle in nützlichen Prozessen, wie der Stickstofffixierung (Agrios, 2005).

Phylum	Familie	Organismus	aquatic (%)	plant (%)	soil (%)	animal (%)	Risk group
Bacteroidota	Weeksellaceae	Myroides odoratimimus	6.7	2.9	14.9	40.3	2
Bacteroidota	Weeksellaceae	Chryseobacterium gleum	22.1	2.9	16.5	30.9	2
Bacteroidota	Weeksellaceae	Chryseobacterium hagamense	22.1	2.9	16.5	30.9	1
Bacteroidota	Weeksellaceae	Chryseobacterium lathyri	22.1	2.9	16.5	30.9	2
Bacteroidota	Weeksellaceae	Chryseobacterium rhizosphaerae	22.1	2.9	16.5	30.9	1
Bacteroidota	Weeksellaceae	Elizabethkingia miricola	20.1	3.8	5.4	30.5	2
Bacteroidota	Weeksellaceae	Chryseobacterium shandongense	16.9	5.5	5.9	26.4	1
Bacteroidota	Weeksellaceae	Chryseobacterium aquaticum	20.1	8.4	6.4	25.7	1
Bacteroidota	Weeksellaceae	Chryseobacterium scophthalmum	13.2	21.8	4.4	20.3	2
Bacteroidota	Weeksellaceae	Chryseobacterium indoltheticum	6.5	27.8	11.3	20.2	1
Bacteroidota	Weeksellaceae	Chryseobacterium soldanellicola	18.2	2.6	3.9	14.3	1
Bacteroidota	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium faecium	10.9	7.9	6.5	37.2	1
Bacteroidota	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium multivorum	10.9	7.9	6.5	37.2	2
Bacteroidota	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium zeae	3.9	19.9	9.0	7.7	1
Bacteroidota	Flavobacteriaceae	Flavobacterium frigidimaris	13.1	4.1	18.6	18.2	1
Bacteroidota	Flavobacteriaceae	Flavobacterium johnsoniae	13.1	4.2	17.5	18.0	1
Bacteroidota	Flavobacteriaceae	Flavobacterium chungbukense	8.7	4.4	39.1	13.0	1
Bacteroidota	Flavobacteriaceae	Flavobacterium banpakuense	35.3	7.8	26.5	6.9	1

Abbildung 18: Bakterielle Spezies des Phylums Bacteriodota – Isolierung, Nischenzuordnung und Risikobewertung.

Wichtige Aussagen für Gemüse und Verderb (Abbildung 17):

Chryseobacterium indoltheticum und Chryseobacterium shandongense sind besonders relevant für Pflanzenpathogenität und Verderb, da sie Pflanzen infizieren und bei unsachgemäßer Lagerung von Gemüse zu Verderb führen können. Sphingobacterium multivorum ist bekannt dafür, Verderb von Lebensmitteln, einschließlich Gemüse, zu verursachen (Schneider, 2018).

Phylum	Familie	Organismus	aquatic (%)	plant (%)	soil (%)	animal (%)	Risk group
Bacillota	Staphylococcaceae	Staphylococcus haemolyticus	1.8	0.0	7.0	70.9	2
Bacillota	Staphylococcaceae	Staphylococcus hominis	1.8	0.0	7.0	70.9	2
Bacillota	Staphylococcaceae	Staphylococcus epidermidis	2.3	0.2	0.4	68.3	2
Bacillota	Staphylococcaceae	Staphylococcus gallinarum	3.8	1.9	2.3	57.7	1
Bacillota	Staphylococcaceae	Staphylococcus succinus	3.8	1.9	2.3	57.7	1
Bacillota	Staphylococcaceae	Staphylococcus xylosus	3.8	1.9	2.3	57.7	1
Bacillota	Staphylococcaceae	Staphylococcus sciuri	2.0	0.9	2.2	55.4	1
Bacillota	Staphylococcaceae	Staphylococcus equorum	2.7	2.0	3.8	53.4	1
Bacillota	Staphylococcaceae	Staphylococcus fleurettii	1.7	2.9	1.4	51.0	1
Bacillota	Enterococcaceae	Enterococcus faecium	3.4	0.9	1.4	69.5	2
Bacillota	Enterococcaceae	Enterococcus thailandicus	3.4	0.9	1.4	69.5	1
Bacillota	Enterococcaceae	Enterococcus casseliflavus	5.8	3.3	2.1	57.7	2
Bacillota	Streptococcaceae	Lactococcus lactis	6.0	2.0	3.1	56.9	1
Bacillota	Streptococcaceae	Lactococcus raffinolactis	14.7	1.8	6.0	41.2	1
Bacillota	Aerococcaceae	Aerococcus viridans	7.6	2.2	4.6	49.3	2
Bacillota	Lactobacillaceae	Weissella cibaria	5.2	3.0	3.0	54.0	1
Bacillota	Lactobacillaceae	Lactobacillus sakei	6.5	2.6	3.5	52.2	1
Bacillota	Lactobacillaceae	Leuconostoc lactis	7.3	2.5	4.3	47.4	1
Bacillota	Lactobacillaceae	Leuconostoc citreum	7.2	3.1	3.7	45.7	1
Bacillota	Lactobacillaceae	Leuconostoc gelidum	5.9	3.6	4.2	44.8	1
Bacillota	Lactobacillaceae	Leuconostoc mesenteroides	8.3	3.6	4.8	42.1	2
Bacillota	Lactobacillaceae	Weissella viridescens	5.6	3.5	3.8	40.7	1
Bacillota	Carnobacteriaceae	Carnobacterium divergens	8.4	1.9	3.8	42.2	1
Bacillota	Carnobacteriaceae	Carnobacterium maltaromaticum	12.5	1.9	6.6	38.0	2
Bacillota	Listeriaceae	Brochothrix thermosphacta	8.3	2.2	5.5	44.4	1
Bacillota	Bacillaceae	Bacillus amyloliquefaciens_ssp_plantarum	8.7	5.8	11.5	29.5	1
Bacillota	Bacillaceae	Bacillus amyloliquefaciens	8.7	5.8	11.5	29.5	1
Bacillota	Bacillaceae	Bacillus mojavensis	8.7	5.8	11.5	29.5	1
Bacillota	Bacillaceae	Bacillus subtilis	8.7	5.8	11.5	29.5	1
Bacillota	Bacillaceae	Exiguobacterium mexicanum	19.3	4.5	4.9	27.3	1
Bacillota	Bacillaceae	Bacillus sonorensis	15.5	2.8	10.0	25.2	1
Bacillota	Bacillaceae	Exiguobacterium indicum	16.0	6.8	7.8	24.2	1
Bacillota	Bacillaceae	Bacillus altitudinis	9.8	9.1	20.1	18.9	1
Bacillota	Bacillaceae	Bacillus pumilus	9.8	9.1	20.1	18.9	1
Bacillota	Bacillaceae	Bacillus cereus	5.1	12.4	22.0	17.5	2
Bacillota	Bacillaceae	Bacillus mycoides	5.1	12.4	22.0	17.5	2
Bacillota	Bacillaceae	Bacillus thuringiensis	5.1	12.4	22.0	17.5	1
Bacillota	Bacillaceae	Bacillus atrophaeus	11.0	4.4	4.4	16.7	1
Bacillota	Bacillaceae	Exiguobacterium oxidotolerans	41.1	5.9	3.4	13.2	1
Bacillota	Listeriaceae	Listeria grayi	6.1	1.7	2.6	22.3	1
Bacillota	Paenibacillaceae	Paenibacillus amylolyticus	7.1	2.0	52.3	6.2	1
Bacillota	Paenibacillaceae	Paenibacillus lautus	7.1	2.0	52.3	6.2	1

Abbildung 19: Bakterielle Spezies des Phylums Bacillota – Isolierung, Nischenzuordnung und Risikobewertung.

Wichtige Aussagen für Gemüse und Verderb (Abbildung 18):

Bacillus cereus, Bacillus mycoides sind besonders relevant für Lebensmittelverderb, da sie Toxine produzieren können, die zu Lebensmittelvergiftungen führen (Bottone, 2010). Bacillus subtilis und verwandte Arten werden oft als Biocontrol-Agenten eingesetzt, können jedoch unter bestimmten Bedingungen auch an Verderbsprozessen beteiligt sein (Agrios, 2005). Brochothrix thermosphacta ist bekannt dafür, Verderb von Fleisch und Gemüse zu verursachen. Enterococcus-Arten dienen oft als Indikatoren für Hygienemängel und Verderb in Lebensmitteln.

Phylum	Familie	Organismus	aquatic (%)	plant (%)	soil (%)	animal (%)	Risk group
Pseudomonadota	Enterobacteriaceae	Kosakonia cowanii	1.7	1.4	2.9	66.1	2
Pseudomonadota	Enterobacteriaceae	Leclercia adecarboxylata	4.4	4.5	2.8	58.5	2
Pseudomonadota	Enterobacteriaceae	Citrobacter amalonaticus	7.6	3.0	3.4	54.1	2
Pseudomonadota	Enterobacteriaceae	Citrobacter freundii	7.6	3.0	3.4	54.1	2
Pseudomonadota	Enterobacteriaceae	Enterobacter bugandensis	6.6	6.0	3.0	49.5	2
Pseudomonadota	Enterobacteriaceae	Enterobacter kobei	10.1	2.6	1.7	43.9	2
Pseudomonadota	Enterobacteriaceae	Lelliottia amnigena	8.3	10.4	5.3	33.0	2
Pseudomonadota	Yersiniaceae	Serratia fonticola	7.4	3.1	4.0	57.2	1
Pseudomonadota	Yersiniaceae	Serratia liquefaciens	7.4	3.1	4.0	57.2	2
Pseudomonadota	Yersiniaceae	Serratia marcescens	7.4	3.1	4.0	57.2	2
Pseudomonadota	Yersiniaceae	Rahnella aquatilis	13.9	8.4	5.6	33.3	1
Pseudomonadota	Yersiniaceae	Serratia proteamaculans	13.2	8.5	8.6	28.7	2
Pseudomonadota	Yersiniaceae	Serratia plymuthica	13.4	6.9	11.7	27.0	1
Pseudomonadota	Erwiniaceae	Erwinia rhapontici	6.5	4.3	3.9	55.0	1
Pseudomonadota	Erwiniaceae	Erwinia aphidicola	6.8	7.6	5.1	49.7	1
Pseudomonadota	Erwiniaceae	Erwinia persicina	6.8	7.6	5.1	49.7	1
Pseudomonadota	Erwiniaceae	Pantoea sp	7.5	10.8	4.0	38.0	2
Pseudomonadota	Erwiniaceae	Pantoea ananatis	4.8	13.4	5.3	31.5	1
Pseudomonadota	Erwiniaceae	Pantoea vagans	4.8	13.4	5.3	31.5	1
Pseudomonadota	Erwiniaceae	Pantoea agglomerans	4.8	13.4	5.3	31.5	2
Pseudomonadota	Hafniaceae	Hafnia alvei	10.0	5.0	4.8	43.4	2
Pseudomonadota	Moraxellaceae	Moraxella osloensis	14.1	2.5	5.7	38.6	2
Pseudomonadota	Moraxellaceae	Acinetobacter beijerinckii	21.6	2.9	3.3	27.4	2
Pseudomonadota	Moraxellaceae	Acinetobacter johnsonii	21.6	2.9	3.3	27.4	2
Pseudomonadota	Moraxellaceae	Acinetobacter lactucae	21.6	2.9	3.3	27.4	2
Pseudomonadota	Moraxellaceae	Acinetobacter calcoaceticus	13.9	6.9	9.1	23.3	2
Pseudomonadota	Rhizobiaceae	Agrobacterium radiobacter	8.8	7.8	6.3	39.9	1
Pseudomonadota	Pectobacteriaceae	Pectobacterium betavasculorum	13.8	7.6	5.6	26.7	1
Pseudomonadota	Shewanellaceae	Shewanella baltica	22.9	0.4	1.2	24.8	1
Pseudomonadota	Shewanellaceae	Shewanella putrefaciens	22.9	0.4	1.2	24.8	2
Pseudomonadota	Yersiniaceae	Rahnella inusitata	21.3	11.0	3.6	21.9	1
Pseudomonadota	Oxalobacteraceae	Janthinobacterium lividum	19.5	8.4	17.4	17.0	1
Pseudomonadota	Chromatiaceae	Rheinheimera soli	25.1	7.3	4.9	13.4	1

Abbildung 20: Bakterielle Spezies des Phylums Pseudomonadota (Teil 1) – Isolierung, Nischenzuordnung und Risikobewertung.

Wichtige Aussagen für Gemüse und Verderb (Abbildung 19):

Pantoea agglomerans und Pantoea ananatis sind besonders relevant für Pflanzenpathogenität und Lebensmittelverderb, da sie Pflanzen infizieren und bei unsachgemäßer Lagerung von Gemüse zu Verderb führen können. Pectobacterium betavasculorum ist bekannt dafür, Fäulnis in Gemüse zu verursachen. Erwinia rhapontici kann Pflanzenkrankheiten verursachen und ist besonders relevant für Gemüse wie Rote Bete. Serratia plymuthica kann als opportunistischer Pflanzenpathogen auftreten und ist in der Lage, Pflanzen zu infizieren sowie an Verderbsprozessen in Lebensmitteln beteiligt zu sein.

Phylum	Familie	Organismus	aquatic (%)	plant (%)	soil (%)	animal (%)	Risk group
Pseudomonadota	Lysobacteraceae	Stenotrophomonas maltophilia	12.8	2.9	7.9	37.5	2
Pseudomonadota	Lysobacteraceae	Xanthomonas campestris	7.3	7.6	10.8	30.3	1
Pseudomonadota	Lysobacteraceae	Stenotrophomonas sp	19.2	4.1	7.5	26.1	1
Pseudomonadota	Sphingomonadaceae	Sphingomonas pseudosanguinis	12.6	9.6	4.1	34.0	1
Pseudomonadota	Sphingomonadaceae	Sphingomonas parapaucimobilis	12.6	9.6	4.1	34.0	2
Pseudomonadota	Sphingomonadaceae	Sphingomonas sanguinis	12.6	9.6	4.1	34.0	1
Pseudomonadota	Sphingomonadaceae	Sphingomonas yabuuchiae	24.3	2.3	2.8	31.4	1
Pseudomonadota	Sphingomonadaceae	Sphingomonas paucimobilis	15.7	10.1	12.5	22.1	2
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas chlororaphis	6.7	20.0	20.0	40.0	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas lutea	14.8	5.4	5.9	29.3	2
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas flavescens	14.3	12.4	1.9	28.6	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas antarctica	10.6	19.1	6.0	23.6	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas extremorientalis	10.6	19.1	6.0	23.6	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas grimontii	10.6	19.1	6.0	23.6	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas fluorescens	10.6	19.1	6.0	23.6	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas orientalis	10.6	19.1	6.0	23.6	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas oryzihabitans	10.6	19.1	6.0	23.6	2
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas poae	10.6	19.1	6.0	23.6	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas rhodesiae	10.6	19.1	6.0	23.6	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas veronii	10.6	19.1	6.0	23.6	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas proteolytica	11.8	17.7	6.3	23.2	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas azotoformans	11.8	17.7	6.3	23.2	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas gessardii	11.8	17.7	6.3	23.2	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas libanensis	11.8	17.7	6.3	23.2	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas marginalis	11.8	17.7	6.3	23.2	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas synxantha	11.8	17.7	6.3	23.2	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas tolaasii	11.8	17.7	6.3	23.2	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas protegens	13.3	10.1	11.7	22.6	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas putida	11.4	8.3	12.1	21.8	2
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas fragi	16.6	11.4	9.2	21.7	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas graminis	16.6	11.4	9.2	21.7	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas jessenii	16.6	11.4	9.2	21.7	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas taetrolens	16.6	11.4	9.2	21.7	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas monteilii	13.1	10.2	8.9	19.3	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas mosselii	13.1	10.2	8.9	19.3	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas mucidolens	13.1	10.2	8.9	19.3	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas composti	23.4	10.8	2.7	19.0	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas jinjuensis	12.4	2.7	27.6	17.3	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas brassicacearum	11.3	6.7	21.9	14.9	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas kilonensis	11.3	6.7	21.9	14.9	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas thivervalensis	11.3	6.7	21.9	14.9	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas corrugata	11.3	6.7	21.9	14.9	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas mandelii	11.3	6.7	21.9	14.9	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas viridiflava	9.5	13.6	11.9	12.6	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas congelans	14.8	6.2	31.8	10.0	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas koreensis	8.5	12.6	15.9	9.9	1
Pseudomonadota	Pseudomonadaceae	Pseudomonas vancouverensis	8.5	12.6	15.9	9.9	1
Pseudomonadota	Aeromonadaceae	Aeromonas eucrenophila	31.0	2.0	3.2	26.0	1
Pseudomonadota	Aeromonadaceae	Aeromonas veronii	40.3	1.8	2.4	17.2	2
Pseudomonadota	Aeromonadaceae	Aeromonas hydrophila	38.1	2.2	5.8	16.0	2
Pseudomonadota	Aeromonadaceae	Aeromonas media	38.1	2.2	5.8	16.0	1

Abbildung 21: Bakterielle Spezies des Phylums Pseudomonadota (Teil 2) – Isolierung, Nischenzuordnung und Risikobewertung.

Wichtige Aussagen für Gemüse und Verderb (Abbildung 20): Xanthomonas campestris ist besonders relevant für Pflanzenpathogenität, da es Pflanzen infizieren und zu Ertragsverlusten führen kann. Pseudomonas fluorescens kann sowohl Pflanzenkrankheiten verursachen als auch an Verderbsprozessen in Lebensmitteln beteiligt sein. Pseudomonas marginalis kann Pflanzenkrankheiten verursachen und ist besonders relevant für Gemüse. Pseudomonas putida kann an Verderbsprozessen in Lebensmitteln beteiligt sein.

Die Risikobewertung der einzelnen Keimgruppen ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Das spezifische Verderbspotenzial durch Protein- und Fettabbau wird in Tabelle 2 detailliert dargestellt.

Tabelle 1: Risikobewertung der Keimgruppen (bakterielle Phyla).

Phylum	Spezies	Risikopotenzial	Relevanz für Verderb/Pflanzenkrankheiten
Proteobacteria	Pseudomonas putida	Hoch (Verderb)	Enzymatische Zersetzung (Proteasen, Lipasen)
	Erwinia carotovora	Hoch (Pflanzenpathogen)	Weichfäule bei Gemüse
	Serratia marcescens	Mittel (opportunistisch)	Schleimbildung, Lagerverluste
Firmicutes	Bacillus cereus	Hoch (Toxinbildung)	Lebensmittelvergiftung, Sporenbildung
	Enterococcus faecium	Mittel (Hygieneindikator)	Kontamination durch mangelhafte Verarbeitung
Actinobacteria	Clavibacter michiganensis	Hoch (Pflanzenpathogen)	Ringfäule bei Kartoffeln/Tomaten
Bacteroidetes	Chryseobacterium indologenes	Niedrig-Mittel	Verderb bei feuchter Lagerung

Tabelle 2: Keime mit Protein- und Fettabbau-Potenzial.

Keim	Proteolyse (Proteinabbau)	Lipolyse (Fettverderb)	Relevanz
Pseudomonas putida	✓ Stark (Proteasen)	✓ Stark (Lipasen)	Hauptverantwortlich für Verderb in feuchten Lebensmitteln
Serratia marcescens	✓ Mittel	✓ Schwach	Verderb bei Lagerung (Schleimbildung)
Bacillus cereus	✓ Stark (Metalloproteasen)	✓ Mittel (Lipasen)	Toxinbildung + Verderb in gekochten Produkten

Kernaussagen für die Praxis:

Risikobewertung: Identifikation von Hochrisiko-Erregern (z. B. Pseudomonas syringae, Xanthomonas campestris).

Prävention:

Einsatz von Biokontrollstämmen (z. B. Bacillus subtilis gegen Erwinia).

Optimierung von Fruchtfolgen oder Bewässerungsmanagement.

Monitoring: Regelmäßige Überwachung der Pathogen-Dynamik

Einsatz von Bacillus thuringiensis (Bt) Biopestiziden gegen Schädlinge

Bt ist kein Ersatz für antimikrobielle Biokontrollmittel (z. B. Pseudomonas oder Trichoderma), aber kann indirekt durch Reduktion von Insektenschäden die Pflanzenresistenz verbessern.

Indirekte Effekte von Bt: Konkurrenzverdrängung: Bt-Stämme können im Boden oder auf Blattoberflächen mit Pathogenen um Nährstoffe konkurrieren.

Synergien mit anderen Biokontrollmitteln: Kombiniert mit Bacillus subtilis oder Pseudomonas fluorescens kann Bt das mikrobielle Gleichgewicht zugunsten pflanzengesundheitsfördernder Bakterien verschieben (Braun und Lydon, 2019).

5.2.4 Aussagen für Pathogenität und Nischenzuordnung-Risikogruppe 2

Bacillus cereus und Bacillus mycoides verursachen Lebensmittelvergiftungen durch Toxinproduktion. Enterococcus faecium dient als Indikator für Hygienemängel. Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus und Staphylococcus hominis verursachen opportunistische Infektionen und besiedeln häufig Haut und Schleimhäute. Pantoea agglomerans löst Pflanzenkrankheiten aus und trägt zum Lebensmittelverderb bei. Pseudomonas putida ist am Lebensmittelverderb beteiligt. Serratia marcescens, Serratia liquefaciens und Serratia proteamaculans verursachen opportunistische Infektionen und kommen in Wasser, Boden und auf Pflanzen vor.

5.2.5 Häufige Isolate mit Relevanz für Verderb oder Pflanzenpathogenität in den einzelnen Salaten und Gemüse

In Abbildung 22 wird die Verteilung der hoch abundanten Bakterien und Hefen (n=>2) in Verbindung mit den verschiedenen Salatsorten und Gemüsearten dargestellt. Diese Darstellung dient als Grundlage für eine Risikoanalyse, die auf der Häufigkeit des Auftretens der Mikroorganismen basiert. Anhand dieser Daten können potenzielle Risiken identifiziert und gezielte Maßnahmen zur Minimierung der mikrobiologischen Belastung abgeleitet werden.

In den Tabellen 2 und 3 wird eine detaillierte Risikoanalyse der an den häufigsten vorkommenden Bakterien präsentiert. Auf dieser Grundlage werden gezielte Maßnahmen für die an den stärksten betroffenen Salaten und Gemüsearten abgeleitet. Mithilfe der Analyse können potenzielle Risiken identifiziert und spezifische Hygiene- und Lagerstrategien entwickelt werden, um die mikrobiologische Sicherheit und Qualität der Produkte zu gewährleisten. Hohes Risiko geht vor allem von Bacillus cereus/thuringiensis und Pseudomonas spp. aus. Diese Keime sind die kritisch, da sie sowohl Toxinbildung (pBC) als auch schnellen Verderb verursachen können. Um diese Risiken zu minimieren, sollte der Fokus auf einer konsequenten Kühlung, strengen Hygienemaßnahmen und trockenem Lagern liegen, um Toxinbildung und Verderb zu verhindern.

Ein mittleres Risiko stellt Pantoea agglomerans dar, das sowohl Verderb als auch pflanzenpathogene Effekte haben kann. Hier sind separate Lagerung und ein optimierter Erntezeitpunkt entscheidend, um das Risiko zu reduzieren.

Als geringes Risiko eingestuft werden Chryseobacterium lathyri, Shewanella baltica, Sphingobacterium faecium und Exiguobacterium mexicanum. Diese Keime sind weniger bedenklich, erfordern jedoch Grundhygienemaßnahmen wie regelmäßige Reinigung und trockene Lagerung.

Zu den priorisierten Maßnahmen gehören das Einhalten der Kühlkette (insbesondere für Bacillus und Pseudomonas), die Kontrolle der Feuchtigkeit (um Verderb durch Pseudomonas und Chryseobacterium zu vermeiden), das Vermeiden von Kreuzkontamination (durch getrennte Lagerung und Desinfektion) sowie ein regelmäßiges Monitoring durch mikrobiologische Kontrollen und Dokumentation. Diese Schritte tragen dazu bei, sowohl gesundheitliche Risiken als auch Qualitätsverluste zu minimieren.

	Vogerlsalat	Rucola	Blattspinat	Pflücksalat	Pak Choi	Jahreszeit Mischung	Eisbergsalat	Venezia Salat	Deluxe Salat	Mix Salat	Gurke	Paprika	Zucchini	Melanzani	Tomaten	Blätter von Gurke/Zucchini	Substrat ohne Tomatenpflanze	Gurkensubstrat		
Acinetobacter beijerinckii	3	1			1															
Acinetobacter lactucae	1				1														*Acinetobacter*	7
Aerococcus viridans				1							2								*Aerococcus*	3
Aeromonas media		1	1																*Aeromonas*	2
Agrobacterium radiobacter	3	1																	*Agrobacterium*	4
Bacillus amyloliquefaciens ssp. plantarum	1	3	1								1									
Bacillus altitudinis	1							1												
Bacillus amyloliquefaciens		2		1																
Bacillus atrophaeus		3																		
Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis	9	4	2	3	1						5	10	3	1	2	1		1		
Bacillus mycoides	1	1										1								
Bacillus pumilus	3								1			1								
Bacillus subtilis			1												1				*Bacillus*	66
Brochothrix thermosphacta			2																*Brochothrix*	2
Carnobacterium maltaromaticum		1	1			1													*Carnobacterium*	3
Chryseobacterium indoltheticum			3						1		1									
Chryseobacterium lathyri	4																			
Chryseobacterium scophthalmum	2	2	1		1						1								*Chryseobacterium*	16
Curtobacterium flaccumfaciens								1			3	2		1	1				*Curtobacterium*	8
Enterobacter bugandensis		1										1	1	1						
Enterobacter cloacae	2	1												1					*Enterobacter*	8
Enterococcus casseliflavus			2										1						*Enterococcus*	3
Erwinia persicina		1	1			1	1												*Erwinia*	4
Exiguobacterium indicum		2																		
Exiguobacterium mexicanum		2	4	1															*Exiguobacterium*	9
Flavobacterium oncorhynchi	2																		*Flavobacterium*	2
Glutamicibacter arilaitensis	1	1	2										1							
Glutamicibacter mysorens			1								1								*Glutamicibacter*	7
Hafnia alvei			2																*Hafnia*	2
Lactococcus lactis	2																		*Lactococcus*	2
Leclercia adecarboxylata			1									1							*Leclercia*	2
Leuconostoc mesenteroides						1								1					*Leuconostoc*	2
Lysinibacillus fusiformis	2																		*Lysinibacillus*	2
Microbacterium phyllosphaerae	3	2												1			1			
Microbacterium testaceum	1										2								*Microbacterium*	10
Micrococcus luteus	1											2		1					*Micrococcus*	4
Moesziomyces aphidis												2							*Moesziomyces*	2
Paenarthrobacter aurescens		4				1		1												
Paenarthrobacter ilicis		2	1																*Paenarthrobacter*	9
Paenibacillus amylolyticus		2																	*Paenibacillus*	2
Pantoea ananatis	1	1	2						1											
Pantoea agglomerans	1	9	9	1		1	1	1		1	1	2	1	1	1	1			*Pantoea*	36
Pseudarthrobacter oxydans	1	2	1		1					1										
Pseudarthrobacter scleromae		1	1																*Pseudarthrobacter*	8
Pseudomonas brassicacearum	3																			
Pseudomonas chlororaphis	4	3	1								1									
Pseudomonas extremorientalis	4	2	2		1		1				1									
Pseudomonas flavescens	3	3	1																	
Pseudomonas fragi		1	1																	
Pseudomonas graminis	2	1								1										
Pseudomonas jessenii	2										1									
Pseudomonas kilanensis	2																			
Pseudomonas koreensis	4	6	2		1			1	1	1	2									
Pseudomonas proteolytica	1	1																		
Pseudomonas taetrolens	2		1																	
Pseudomonas thivervalensis	1	1																		
Pseudomonas viridiflava	3		1																	
Pseudomonas azotoformans	2	2	2								1									
Pseudomonas corrugata	1	1	2																	
Pseudomonas fluorescens	3	4	5		1						2				1					
Pseudomonas gessardii	2										1	1								
Pseudomonas libanensis	1	2	1				1				1	1			1					
Pseudomonas marginalis		1	1				1													
Pseudomonas oryzihabitans											2									
Pseudomonas poae		1	1								1									
Pseudomonas putida	1			1																
Pseudomonas rhodesiae	1	4				1					2									
Pseudomonas synxantha	1	2										2								
Pseudomonas taiaasii	1	2		1			1				1								*Pseudomonas*	138
Rahnella aquatilis			2																*Rahnella*	2
Rheinheimera soli	2	1			1														*Rheinheimera*	4
Serratia liquefaciens		1	2	1								1								
Serratia marcescens			2	1		1						1								
Serratia proteamaculans			1				1												*Serratia*	12
Shewanella baltica			6					1											*Shewanella*	7
Sphingobacterium faecium		3	6						1	1	2									
Sphingobacterium multivorum	2	1		1															*Sphingobacterium*	17
Staphylococcus haemolyticus						1						1								
Staphylococcus hominis	3																			
Staphylococcus sciuri												1	1							
Staphylococcus xylosus		1									3	2	3	2					*Staphylococcus*	18
Weissella cibaria		1		1		1													*Weissella*	3

Abbildung 22: Häufige Isolate mit Relevanz für Verderb oder Pflanzenpathogenität zugeordnet zu den einzelnen Salaten und Gemüse (Daten Feld- und Handelsproben).

Tabelle 3: Risikobewertung der hoch abundanten Bakterien.

Keim	Risiko Lebensmittelsicherheit	Risiko Verderb	Hauptrisikofaktoren	Empfohlene Maßnahmen
Bacillus cereus/thuringiensis	Hoch (Toxinbildung)	Hoch	Unzureichende Kühlung, Kontamination über Erde/Waschwasser	Kühlung, Waschwasserbehandlung, Hygienemonitoring
Pantoea agglomerans	Mittel (opportunistisch)	Hoch	Feuchte Lagerung, Kreuzkontamination	Separate Lagerung, Erntezeitpunkt optimieren
Pseudomonas spp.	Gering (meist nicht humanpathogen)	Hoch	Feuchtigkeit, unsachgemäße Lagerung	Trockene/kühle Lagerung, Oberflächendesinfektion
Chryseobacterium lathyri	Gering	Mittel	Schleimbildung bei feuchter Lagerung	Separate Lagerung, Trockenheit
Shewanella baltica	Gering	Gering	Kontamination über Waschwasser	Waschwasserkontrolle
Sphingobacterium faecium	Gering	Gering	Geruchs-/Geschmacksveränderungen	Kühle Lagerung, Reinigung
Exiguobacterium mexicanum	Gering	Gering	Biofilmbildung in extremen Umgebungen	Desinfektion von Lagerbehältern
Paenarthrobacter aurescens	Gering	Gering	Biofilmbildung	Reinigung der Lagerflächen

Tabelle 4: Empfohlene Maßnahmen für Salat und Gemüse um die Produktsicherheit und -qualität zu gewährleisten.

Gemüse	Dominante Keime	Empfohlene Maßnahmen
Paprika, Gurke	B. cereus, B. thuringiensis (10, 5)	Kühlung, ev. Waschwasserbehandlung
Vogerlsalat	B. cereus, B. thuringiensis (9), Chryseobacterium lathyri (4), Pseudomonas chlororaphis (4), Ps. extremorientalis (4), Ps. koreensis (4)	Separate Lagerung, Mikrobiologisches Monitoring
Rucola	Pantoea agglomerans (9), Ps. koreensis (6), B. cereus, B. thuringiensis (4), P. fluorescens (4), P. rhodesieae (4), Paenarthrobacter aurescens (4)	Separate Lagerung, Mikrobiologisches Monitoring
Blattspinat	Pantoea agglomerans (9), Shewanella baltica (6), Sphingobacterium faecium (6), P. fluorescens (5), Exiguobacterium mexicanum (4)	Erntezeitpunkt optimieren

5.2.6 Subtypisierungsergebnisse für pBC (AP2-AP4)

Im Rahmen der Subtypisierungsstudie wurden alle isolierten Bacillus cereus-Gruppe-(pBC) Isolate einer umfassenden Charakterisierung unterzogen. Dazu gehörten die ces-PCR, cry2-PCR, das Enterotoxin-Profiling, MLST (Multilocus Sequence Typing) sowie die RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR). Aus diesem Isolatsatz wurden repräsentative Stämme für eine genomische Sequenzierung mittels Oxford-Nanopore-Technologie ausgewählt. Die generierten Sequenzdaten stehen sowohl für

Vergleichsanalysen als auch für zukünftige Forschungsvorhaben zur Verfügung.

Art der Probe	Erzeuger	Produkt	Isolat ID	Isolat ID	Ces Gen	Cry2 Gen	PanC Group	CC	ST	RAPD Profil	ONT
Feld	626	Paprika	BT-G	3	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	5	Sequenziert
Feld	626	Paprika	BT-G	6	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	627	Paprika	BT-G	7	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	627	Paprika	BT-G	9	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	1051	Paprika	BT-G	19	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	1051	Paprika	BT-G	20	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	1340	Tomaten	BT-G	26	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	1340	Tomaten	BT-G	27	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	4592	Tomaten	BT-G	50	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	4592	Tomaten	BT-G	55	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	1466	Gurke	BT-G	77	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	607	Paprika gelb	BT-G	88	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	607	Paprika gelb	BT-G	89	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	617	Paprika gelb	BT-G	91	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	617	Paprika gelb	BT-G	97	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	626a	Paprika gelb	BT-G	100	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	626a	Paprika gelb	BT-G	103	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	627a	Paprika gelb	BT-G	104	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	627a	Paprika gelb	BT-G	105	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	1083	Pak Choi	BT-G	118	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	6	Sequenziert
Feld	1083	Pak Choi	BT-G	121	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	1083	Melanzani	BT-G	127	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	6	Sequenziert
Feld	1083	Melanzani	BT-G	133	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	626/3216	Paprika gelb	BT-G	140	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	626/3216	Paprika gelb	BT-G	142	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	628	Gurke	BT-G	173	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	628	Gurke	BT-G	189	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	626	Paprika rot	BT-G	198	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	6	Sequenziert
Feld	626	Paprika rot	BT-G	217	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	1340	Tomaten	BT-G	220	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	6	Sequenziert
Feld	1438	Blätter von Gurke/Zucchini	BT-G	221	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	7	Sequenziert
Feld	1438	Blätter von Gurke/Zucchini	BT-G	232	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	1468	Gurke	BT-G	233	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	7	Sequenziert
Feld	1468	Gurke	BT-G	240	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	0628	Gurkensubstrat	BT-G	255	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	7	Sequenziert
Feld	0628	Gurkensubstrat	BT-G	258	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	6	Sequenziert
Feld	0626/3667	Paprika gelb	BT-G	267	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	0626/3667	Paprika gelb	BT-G	271	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Feld	0627/4056	Paprika rot	BT-G	281	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	8	Sequenziert
Feld	0627/4056	Paprika rot	BT-G	294	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert

Abbildung 23: Bacillus thuringiensis Isolate aus der Feldstudie mit Ihren genetischen Charakteristika.

In der Feldstudie konnten die pBC-Isolate zu 100 % als Bacillus thuringiensis identifiziert werden, während Bacillus cereus nicht nachweisbar war (n=40). Die Isolate wiesen die typischen Charakteristika von Bacillus thuringiensis subsp. aizawai auf: Sie gehörten dem klonalen Komplex CC8 mit dem Sequenztyp ST15 an, waren ces-negativ, aber cry2-positiv, und zeigten das Toxinprofil A, das die Toxingene nhe, hbl und cytk2 umfasste (https://pubmlst.org/organisms/bacillus-cereus)(Abbildung 23).

Produkt	Proben ID	Isolat ID	Isolat ID	Spezies	Ces Gen	Cry2 Gen	PanC Group	CC	ST	RAPD Profil	ONT
Vogerlsalat	BT-S24	BT-S	220	Bacillus cereus	Neg	Neg	II-1		250	12	Sequenziert
Vogerlsalat	BT-S51	BT-S	412	Bacillus cereus	Neg	Neg	II-1		564	18	Sequenziert
Pflücksalat	BT-S17	BT-S	144	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-3		1137	10	Sequenziert
Pflücksalat	BT-S17	BT-S	145	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-3		1137	10	Sequenziert
Babyspinat	BT-S29	BT-S	256	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-8	365	75	13	Sequenziert
Pflücksalat	BT-S37	BT-S	314	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-8	365	75	15	Sequenziert
Rucola	BT-S56	BT-S	461	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-8		911	16	Sequenziert
Vogerlsalat	BT-S40	BT-S	331	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	8	8	1	Sequenziert
Vogerlsalat	BT-S40	BT-S	348	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	8	8	1	Sequenziert
Rucola	BT-S44	BT-S	372	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	8	8	1	Sequenziert
Rucola	BT-S44	BT-S	376	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	8	8	1	Sequenziert
Babyspinat	BT-S57	BT-S	474	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	8	8	20	Sequenziert
Zucchini	BT-S61	BT-S	493	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	8	8	23	Sequenziert
Gurke	BT-S80	BT-S	614	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	8	8	1	Sequenziert
Zucchini	BT-S101	BT-S	716	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	8	8	25	Sequenziert
Rucola	BT-S3	BT-S	73	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Rucola	BT-S31	BT-S	304	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Rucola	BT-S31	BT-S	309	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	14	Sequenziert
Vogerlsalat	BT-S45	BT-S	377	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Gurke	BT-S81	BT-S	623	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Gurke	BT-S81	BT-S	640	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	2	Sequenziert
Melanzani	BT-S105	BT-S	727	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 aizawai	8	15	6	Sequenziert
Vogerlsalat	BT-S53	BT-S	430	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-4	18	18	19	Sequenziert
Vogerlsalat	BT-S77	BT-S	599	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-4		137	22	Sequenziert
Pflücksalat	BT-S37	BT-S	319	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-4		212	16	Sequenziert
Vogerlsalat	BT-S60	BT-S	489	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-4		744	22	Sequenziert
Vogerlsalat	BT-S60	BT-S	490	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-4		744	22	Sequenziert
Vogerlsalat	BT-S18	BT-S	136	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-7a	97	243	9	Sequenziert
Vogerlsalat	BT-S77	BT-S	601	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-7a		10	24	Sequenziert
Vogerlsalat	BT-S22	BT-S	201	Bacillus cereus	Neg	Neg	V	111	218	11	Sequenziert
Vogerlsalat	BT-S22	BT-S	202	Bacillus cereus	Neg	Neg	V	111	218	11	Sequenziert
Vogerlsalat	BT-S24	BT-S	219	Bacillus cereus	Neg	Neg	V	111	72	11	Sequenziert
Rucola	BT-S48	BT-S	401	Bacillus cereus	Neg	Neg	V	111	278	17	Sequenziert

Abbildung 24: Bacillus cereus und B. thuringiensis Isolate aus der Feldstudie mit Handelsproben mit Ihren genetischen Charakteristika.

In der Feldstudie wurden auch Handelsproben verglichen, davon wurden 34 repräsentative Isolate zur ONT Sequenzierung ausgewählt. Von den untersuchten Isolaten gehörten 19 (n=44; 55,88 %) zur Spezies Bacillus cereus und waren der panC-Gruppe II, III, IV oder V zuzuordnen; alle waren ces-negativ. Weitere 15 Isolate (n=44; 44,12 %) wurden als Bacillus thuringiensis identifiziert, die der panC-Gruppe IV angehörten, jedoch cry2-positiv waren und das Toxinprofil A aufwiesen. Davon ließen sich sieben Isolate der Unterart Bacillus thuringiensis subsp. aizawai und acht der Unterart Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki zuordnen, die als Biopestizide bekannt sind. Insgesamt konnten 16 verschiedene Sequenztypen unterschieden werden. B. cereus ST744, ST1137 und ST218 von denen mehr als nur 1 Isolat vorliegen wurden bisher nur in Einzelstudien oder lokal begrenzten Isolaten (Umwelt, Gewürze) identifiziert (https://pubmlst.org/organisms/bacillus-cereus) (Abbildung 24).

Probe	Isolat ID	Organismus	Ces Gen positiv	Cry2 Gen positiv	PanC Group	RAPD Profil	CC	ST	ONT
24012100	E34	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
24012100	E35	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
24521107	E45	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
24521107	E47	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25016059	E52	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25016059	E54	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25016090	E55	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25016090	E59	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25016091	E63	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25016091	E64	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25022112	E72	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
L500713A85	E86	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
L500713A85	E88	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
250160T3	E90	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25032125	E99	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25032125	E101	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25036025 Platte 1	E139	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25036025 Platte 2	E147	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25043120 Platte 1	E149	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25043120 Platte 1	E151	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25024052	E153	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25024052	E155	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25042066 Platte 1	E156	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25042066 Platte 1	E157	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25091078	E253	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
PE25/082/01 Platte 1	E330	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
PE25/082/01 Platte 1	E331	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
PE25/082/01 Platte 2	E335	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
PE25/082/01 Platte 2	E336	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
PE25/082/01 Blutagar	E337	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
PE25/082/01 Biokar	E338	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25085250	E340	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25085250	E342	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25085250 Blutagar	E344	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25085250 Biokar	E345	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25095090 Platte 1	E347	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25095090 Platte 1	E348	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25095090 Platte 2	E350	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25095090 Platte 2	E353	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25095090 Blutagar	E354	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25095090 Biokar	E355	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25101045	E358	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25101045	E359	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25101045 Blutagar	E361	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25101055	E374	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25101055	E376	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25101055 Blutagar	E378	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25101055 Biokar	E379	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25103008 Blutagar	E385	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25103008 Biokar	E386	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25101059 Biokar	E387	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25101059 Blutagar	E388	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
25043120 Platte 2	E152	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
M24/006/01	E5	Bacillus cereus	Neg	Neg	III-5	26		26	Sequenziert
M25/072/01	E262	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-3	30		14	Sequenziert
M25/72/04	E283	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-3	29	142	48	Sequenziert
M25/72/07	E296	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-3	28		1031	Sequenziert
M25/72/04	E277	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-3	28		1031	Sequenziert
M25/72/07	E294	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-3	28		1031	Sequenziert
PE25/052/2	E250	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	1	8	8	Sequenziert
PE25/052/2	E251	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	1	8	8	Sequenziert
25091078	E255	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	1	8	8	Sequenziert
M2509066	E274	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	1	8	8	Sequenziert
M2509066	E275	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	1	8	8	Sequenziert
PE25/060/01	E297	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	1	8	8	Sequenziert
PE25/060/01	E302	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	1	8	8	Sequenziert
PE25/061/01	E303	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	1	8	8	Sequenziert
PE25/061/01	E304	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	1	8	8	Sequenziert
PE25/64/01	E306	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	1	8	8	Sequenziert
PE25/64/01	E307	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	1	8	8	Sequenziert
25094066	E308	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	1	8	8	Sequenziert
25094066	E309	Bacillus thuringiensis	Neg	Pos	IV-4 kustaki	1	8	8	Sequenziert
M24/006/01	E1	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-4	8	8	8	Sequenziert
25051079 Platte 2	E199	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-4	27		1216	Sequenziert
25051079 Platte 2	E200	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-4	27		1216	Sequenziert
25051079 Plattte 1	E193	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-4	27		1216	Sequenziert
25051079 Plattte 1	E195	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-4	27		1216	Sequenziert
M25/072/01	E263	Bacillus cereus	Neg	Neg	IV-5	31		3306	Sequenziert
PE25/080/1 Platte 2	E319	Bacillus cereus	Neg	Neg	V	32		2195	Sequenziert
PE25/053/01	E225	Bacillus cereus	Neg	Neg	V	11		3119	Sequenziert

Abbildung 25: Bacillus cereus, B. mycoides und B. thuringiensis Isolate von Proben des Sekundärproduzenten mit Ihren genetischen Charakteristika.

In der letzten Phase der Feldstudie wurden auch Proben eines Sekundärproduzenten analysiert. Das Auswahlpanel umfasste insgesamt 80 Isolate, davon 13 Bacillus thuringiensis-Isolate (16,25 %) und 67 Bacillus cereus-Isolate (83,25 %). Sämtliche Isolate waren ces-negativ. Die B. thuringiensis-Isolate ließen sich dem Biopestizid Bt subsp. kurstaki (ST8) zuordnen und wiesen ein cry2-positives Gen sowie das Toxinprofil A auf. Innerhalb der B. cereus-Gruppe dominierte der Sequenztyp ST26, während weitere Isolate den Typen ST1216, ST3306, ST2195 und ST3119) angehörten (vgl. Abbildung 25).

ST26 gehört zu den häufigsten und am weitesten verbreiteten Sequenztypen von B. cereus. Er wird oft in Umweltproben (z. B. Boden, Wasser), Lebensmitteln (z. B. Milchprodukte, Reis, Gewürze) und klinischen Isolaten nachgewiesen. Dieser Typ ist besonders persistent und kann sich in verschiedenen Umgebungen gut anpassen.

ST1031 wurde in Einzelstudien und Umweltisolaten beschrieben, ist aber nicht so weit verbreitet wie ST26 oder ST1. Er wurde unter anderem in Bodenproben, pflanzlichem Material und Lebensmitteln (z. B. Gewürzen, Getreide) nachgewiesen, seltener in klinischen Isolaten.

ST1216 wird vor allem in populationsgenetischen Studien untersucht, um die Diversität der B. cereus-Gruppe zu verstehen. Sein Nachweis hilft, die Verbreitung seltener Klone zu dokumentieren und mögliche neue Virulenzmuster zu erkennen (https://pubmlst.org/organisms/bacillus-cereus).

In Tabelle 5 sind die Sequenztypen aufgelistet die häufig bei Lebensmittelintoxikationen eine Rolle spielen. Die meisten dieser Sequenztypen haben emetisches Potential.

Tabelle 5: Sequenztypen die häufig bei Lebensmittelintoxikation mit Erbrechen auftreten.

ST	Bedeutung
ST1	Der häufigste emetische Klon, weltweit mit Lebensmittelvergiftungen assoziiert. Produziert Cereulid und ist oft in Reisgerichten, Nudeln und Milchprodukten nachweisbar.
ST26	Kann sowohl diarrhoische als auch emetische Stämme umfassen, aber einige ST26-Isolate sind ces-positiv und produzieren Cereulid.
ST7	Ein weiterer klassischer emetischer ST, der der in Ausbrüchen in Europa und Asien identifiziert wurde.
ST31	Wurde in emetischen Ausbrüchen in Verbindung mit Milchprodukten und Fertiggerichten gefunden.
ST47	Seltener, aber in Einzelausbrüchen mit Cereulid-Produktion beschrieben.

5.2.7 Mikrobiom-Analyse (AP2-AP3)

DNA-Extraktion aus verzehrfertigen Salaten und Zucchinischalen

Im Rahmen des Projekts wurde die mikrobielle DNA aus 24 Chargen verzehrfertiger Salate sowie 4 Chargen Zucchinischalen extrahiert. Dazu kamen drei verschiedene DNA-Extraktionskits zum Einsatz:

NucleoSpin Tissue Mini Kit (Machery-Nagel) – für DNA aus Zellen und Gewebe,

NucleoSpin Plant II Mini Kit (Machery-Nagel) – speziell für pflanzliche DNA,

DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen) – optimiert für komplexe Umweltproben.

Die Quantifizierung der extrahierten DNA erfolgte fluorometrisch mit der Qubit-Methode (Thermo Fisher Scientific Inc.). Für die Illumina MiSeq-Sequenzierung wurde eine Mindestkonzentration von 20 ng/µL angestrebt.

Der DNeasy PowerSoil Pro Kit erzielte durchgehend die höchsten DNA-Ausbeuten (stets > 20 ng/µL), während die NucleoSpin-Kits teilweise unter dem Zielwert blieben.

Mikrobielle Belastung

Die Gesamtkeimzahlen lagen zwischen 6,0 und 8,6 log KbE/g, zeigten jedoch keinen erkennbaren Zusammenhang mit der DNA-Ausbeute. Die Anzahl präsumtiver Bacillus cereus-Keime war in allen Proben an der Nachweisgrenze (< 1,0 – < 2,0 log KbE/g).

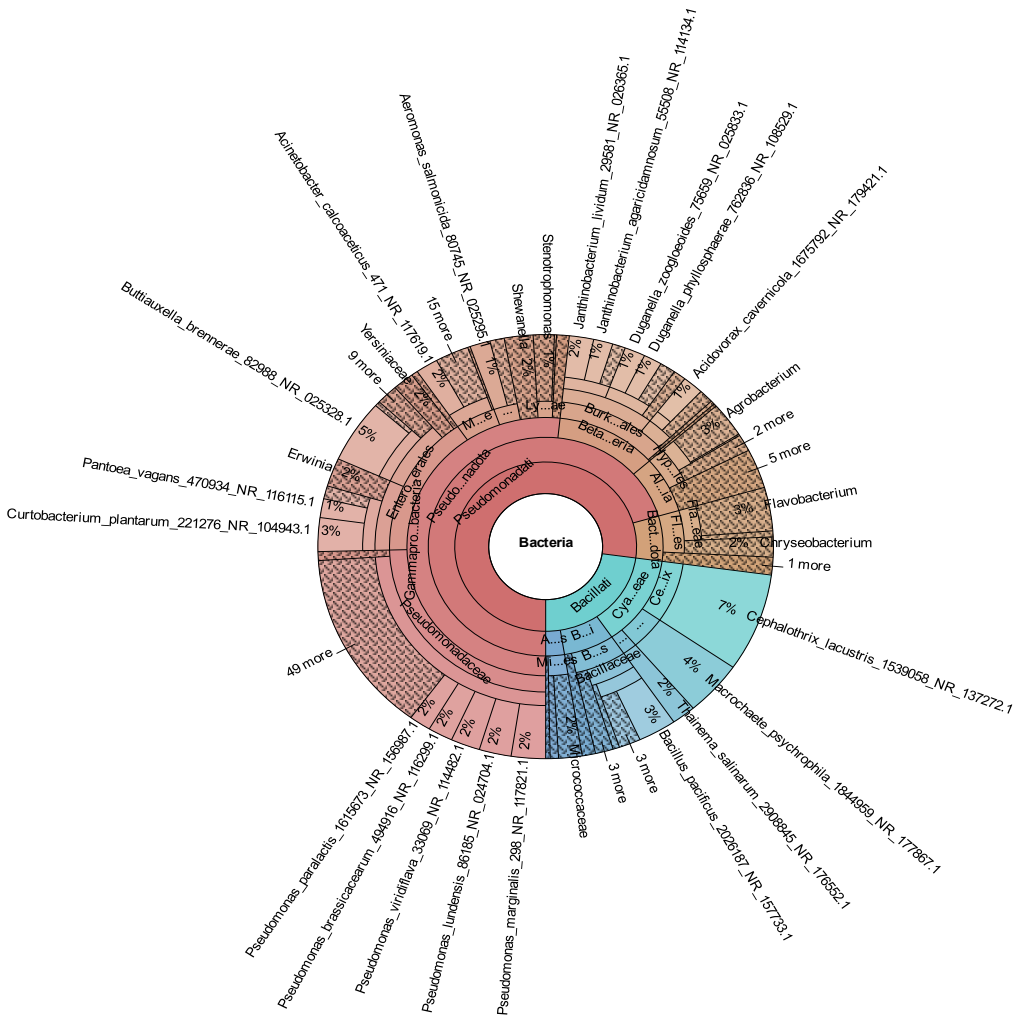

Abbildung 26: Erste Mikrobiomanalyse- Krona Darstellung aus Salatproben (n=21).

Bei der ersten Mikrobiomanalyse unter Verwendung des NucleoSpin Tissue Kits (Machery-Nagel) konnten 21 von 26 Salatproben erfolgreich ausgewertet werden. Die taxonomische Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften dieser Proben ist in Abbildung 26 als Krona-Plot visualisiert. Ein Krona-Plot ist eine interaktive, hierarchische Darstellung mikrobieller Gemeinschaften. Er ermöglicht die gleichzeitige Visualisierung der relativen Häufigkeiten von Taxa (z. B. Bakterienarten) auf verschiedenen taxonomischen Ebenen – von der Domäne bis zur Spezies. Durch die konzentrische Anordnung der Kreissegmente lassen sich Proportionen und Beziehungen zwischen den Mikroorganismen leicht erkennen und vergleichen.

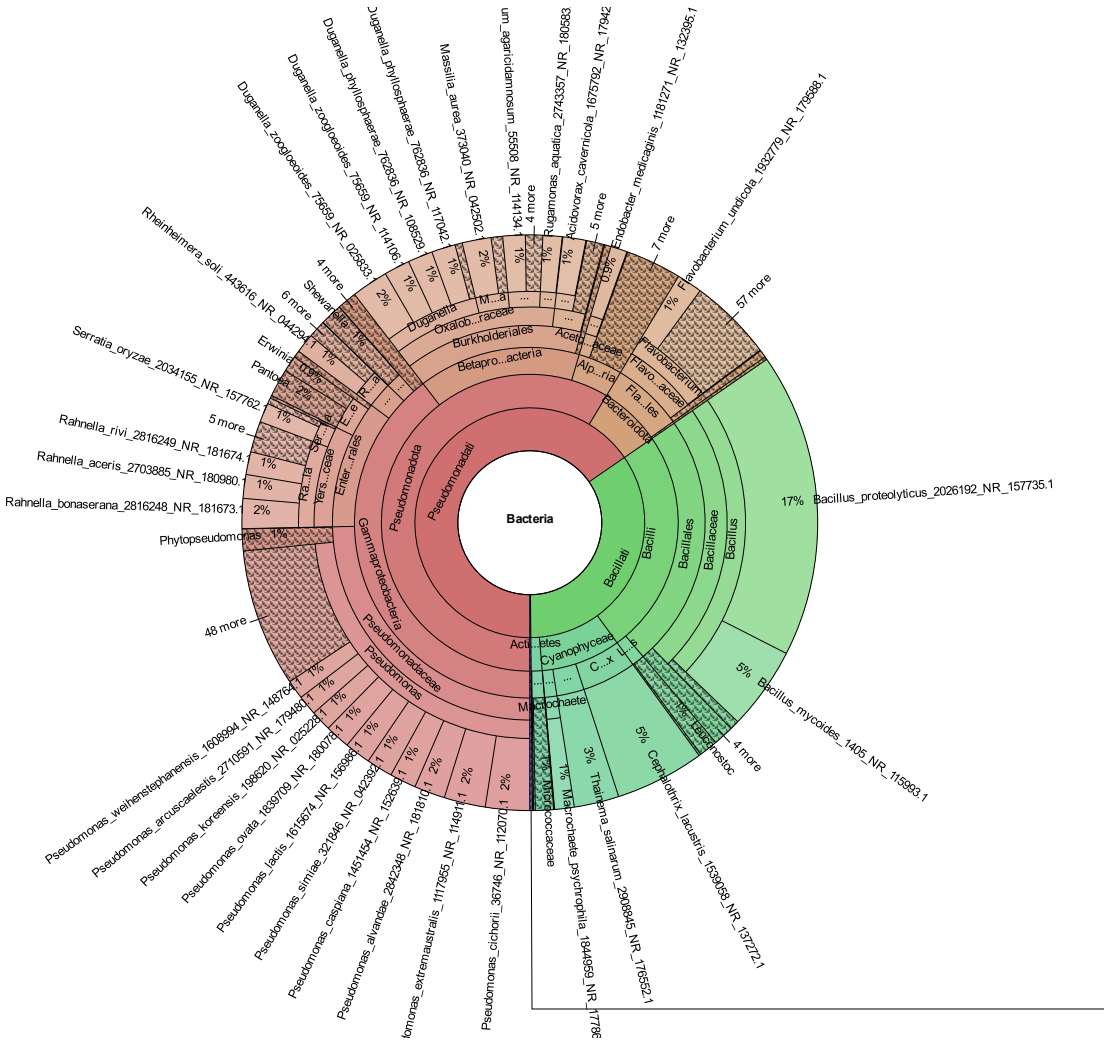

Abbildung 27: Mikrobiomanalyse- Krona Darstellung aus Salat- und Gemüseproben (n=25).

5.2.8 real-time PCR cry2 Gen (Arbeitspaket AP2-AP3)

Der Nachweis des cry2-Gens erfolgte durch eine quantitative Real-Time-PCR (qPCR) nach dem modifizierten Protokoll von Wei et al. (2019). Als Fluoreszenzfarbstoff wurde EvaGreen eingesetzt, ein interkalierender Farbstoff, der unspezifisch in doppelsträngige DNA bindet und bei jeder Amplifikationsrunde ein Fluoreszenzsignal generiert.

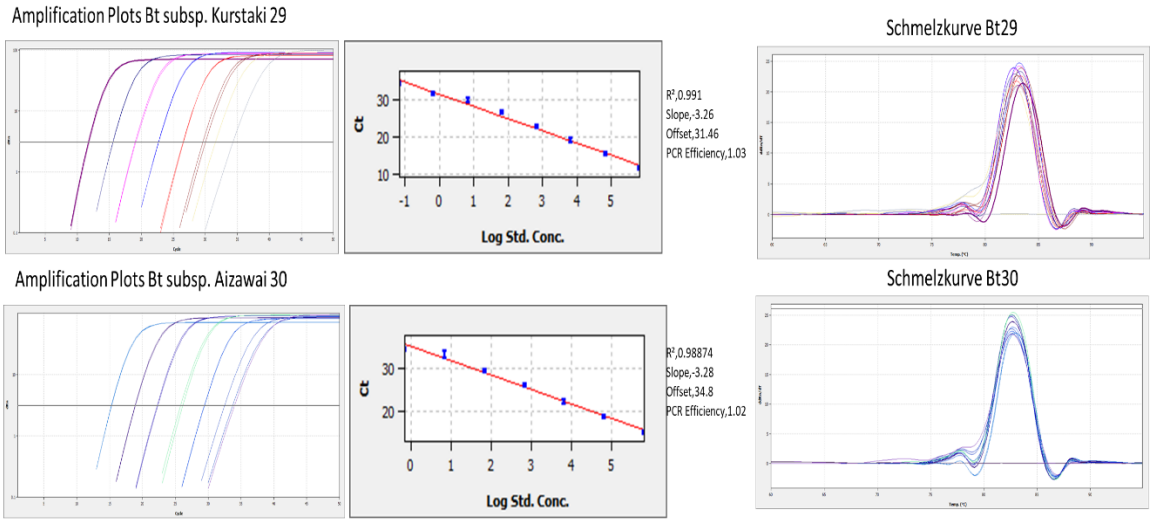

Abbildung 28: Quantitative Real-Time-PCR (qPCR) des Target Gens cry 2 modifiziert nach Wei et al. (2019).

Dargestellt sind die Amplifikationskurven, Standardreihen und Schmelzkurvenanalysen für Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki (Stamm Bt29) und B. thuringiensis subsp. aizawai (Stamm Bt30).

Zur Qualitätskontrolle wurde nach der Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse (60–95 °C) durchgeführt. Die Schmelztemperatur (Tm) der cry2-spezifischen Amplikons wurde mit den Referenzwerten von Wei et al. (2019) abgeglichen, um falsch-positive Signale oder Primer-Dimere auszuschließen. Ein deutlich definierter Peak bei der erwarteten Schmelztemperatur bestätigte die Spezifität der PCR-Produkte.

Die Annealing-Temperatur von 58 °C wurde basierend auf den Primereigenschaften für das cry2-Gen optimiert. Durch den Einsatz der Platinum Taq-DNA-Polymerase wurde eine Hot-Start-PCR realisiert, die unspezifische Amplifikationen effektiv reduziert.

Zusätzlich wurde eine TaqMan-Sonden-basierte qPCR für das cry2-Gen entwickelt. Aufgrund der höheren Kosten eignet sich diese Methode jedoch nicht für den routinemäßigen Einsatz in der Felddiagnostik. Für praktische Anwendungen wird stattdessen das kostengünstigere Eva Green-Assay empfohlen, der eine zuverlässige und spezifische Detektion des cry2-Gens ermöglicht.

5.3 Etablierung und Anwendung eines chemisch-analytischen Workflows (Arbeitspaket AP1 bis AP3)

5.3.1 Optimierung der Probenvorbereitung

Um eine valide Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Methoden hinsichtlich der Extraktion und der Protein Aufreinigung zu gewährleisten, wurde für alle Protokolle eine Mischung der drei Produkte XenTari RaupenFrei, Lepinox®Plus und VectoBac als Probenmaterial verwendet. Die Durchführung des ersten Extraktionsprotokolls erfolgte gemäß den in Planque et al. (2016) dargelegten Vorgaben. Die Durchführung des zweiten Protokolls erfolgte gemäß den von Şahin, Gomis-Cebolla, Güneş und Ferré (2018) vorgestellten Methoden. Für die Proteinanreicherung wurden folgende Methoden verwendet: Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden Einweg-Kartuschen des Herstellers SEC (Cytiva, Wilmington, USA), Ultrafiltrationskartuschen des Herstellers Vivaspin® 6 5K und Vivaspin® 6 10K des Herstellers Sartorius AG (Göttingen, Deutschland) verwendet. Im Rahmen der Verfahren der SEC (Size Exclusion Chromatography) und der Ultrafiltration werden kleinere, störende Substanzen von den hochmolekularen Proteinen abgetrennt. Die Ultrafiltration zeichnet sich zudem durch die Aufkonzentrierung von Proteinen aus. Die Durchführung der Methoden erfolgte unter Befolgung der jeweiligen Herstelleranweisungen. Zur Ermöglichung einer Effektivitätsbewertung der Varianten wurde der lösliche Proteingehalt der Extrakte mittels Bradford-Assay (Bradford, 1976) bestimmt. Die externe Kalibration erfolgte unter Verwendung von BSA. Die Resultate sind in Abbildung 29 dargestellt.

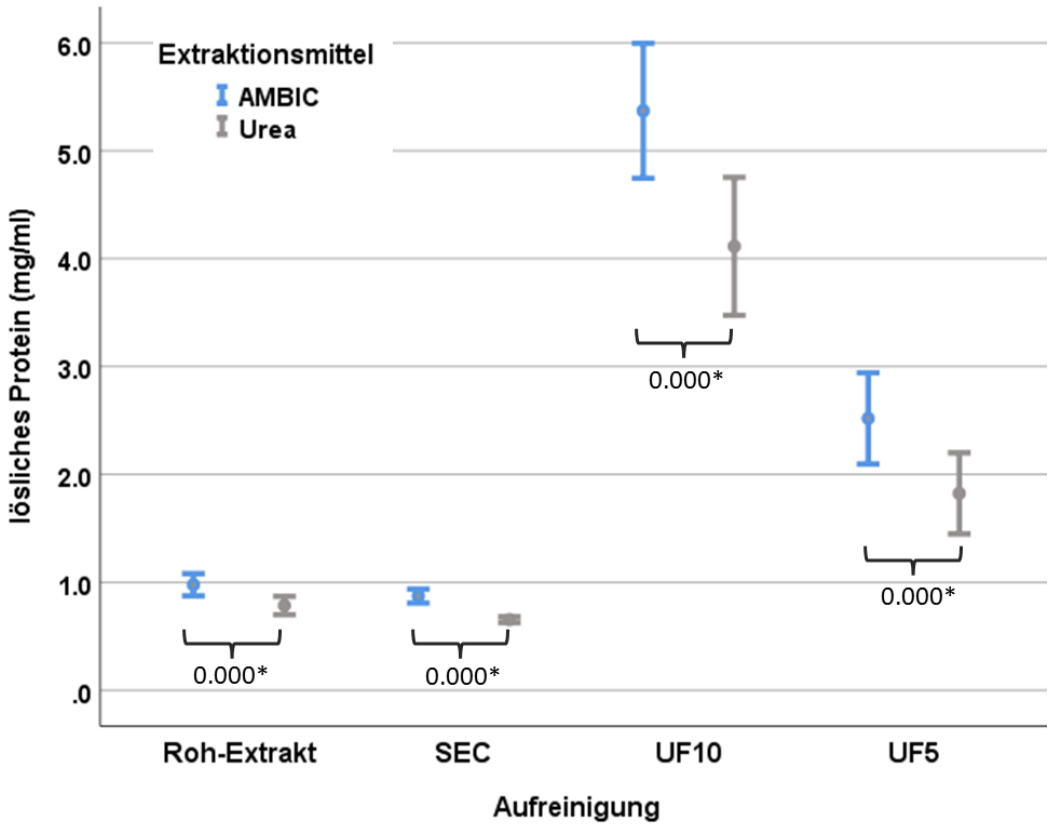

Abbildung 29: Lösliche Proteine von Bt-Präparaten nach der Extraktion mit Harnstoff (Urea) und Ammoniumbicarbonat (AMBIC), aufgereinigt mit Size Exclusion Säulen (SEC), Ultrafiltration (UF) 5 kDa und 10 kDa; *p-Werte unter 0.05 zeigen signifikante Unterschiede

Die Resultate der statistischen Auswertung mittels gepaarten T-Tests weisen darauf hin, dass AMBIC- signifikant höhere Ausbeuten erzielt als UREA-Puffer. Im Rahmen der SEC-Aufreinigung bleibt die Konzentration der Proteine unverändert. Eine signifikante Anreicherung von Proteinen kann durch Ultrafiltration (UF) erzielt werden, insbesondere bei der Verwendung von größeren Membranen mit einer Molekulargewichtssperre von 10 kDA. Auf Basis dieser Ergebnisse ist der Einsatz von AMBIC Puffer in Kombination mit UF bei 10 kDa am erfolgversprechendsten.

5.3.2 Untargeted Proteomics

Zur Identifizierung der Ziel-Analyten wurden untargeted DDA- und DIA-Analysen verschiedener kommerzieller Produkte der B. thuringiensis ssp. kurstaki, aizawai und israelensis durchgeführt. Die Anzucht der Isolate aus den entsprechenden Produkten erfolgte unter Berücksichtigung der Optimierung der Protein-Toxin-Bildung. Gemäß Mounsef et al. (2014) erfolgte die anschließende Proteinaufreinigung, mit dem Ziel der Trennung störender Matrixbestandteile. Die Proteine wurden gemäß Geisslitz et al. (2022) aus dem Pellet gewonnen, tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide aufgereinigt. Die massenspektrometrische Proteomanalyse wurde gemäß den Methoden von Schlachter et al. (2024) durchgeführt. Für jede Subspezies wurden mehrere Produkte untersucht, um die unterschiedlichen Stämme abzudecken. Gemäß den Angaben des Herstellers erfolgte die Applikation eines Produkts pro Stamm zusätzlich auf Basilikumpflanzen. In der vorliegenden Tabelle 1 werden die wichtigsten identifizierten Kristallproteine der Spezies B. thuringiensis ssp. israelensis, aizawai und kurstaki aufgeführt. Die Produkte, die zusätzlich auf Pflanzen angewendet wurden, sind mit * markiert.

Tabelle 6: Übersicht der identifizierten Kristallproteine in den analysierten Bt-Präparaten

Bt Subspezies	Produkt (Bt Stamm)	Identifizierte Proteine
Israelensis	Gnatrol SC (AM65-52)	Cry11Aa, Cry4Aa, Cry4Ba
Israelensis	Neudomück Pro (AM65-52)	Cry11Aa, Cry4Aa, Cry4Ba
Israelensis	VectoBac* (AM65-52)	Cry11Aa, Cry4Aa, Cry4Ba
Aizawai	Xentari* (ABTS-1857 & GC-91)	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Fa
Aizawai	FlorBac (ABTS-1857 & GC-91)	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Fa
Kurstaki	DiPel DF (ABTS-351)	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ia, Cry2Aa, Cry2Ab
Kurstaki	Solabiol Zünsler-& Raupenfrei* (ABTS-351)	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ia, Cry2Aa, Cry2Ab
Kurstaki	LepinoxPlus* (EG-2348)	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ia, Cry2Aa, Cry2Ab

Die Ergebnisse zeigen, dass die Probenvorbereitung (Isolierung und Anzüchtung oder Anwendung auf der Pflanze) keinen Einfluss auf das Proteinprofil hat. Für die B. thuringiensis ssp. kurstaki konnten keine Unterschiede im Proteinprofil in Abhängigkeit vom Stamm festgestellt werden. Die Stämme ABTS-351 und EG-2348 weisen die gleichen sechs Kristallproteine auf. Die beiden Toxine Cry1Aa und Cry1Ab werden sowohl von der B. thuringiensis ssp. kurstaki, als auch von der B. thuringiensis ssp. aizawai produziert (Tabelle 6).

5.3.3 Selektion von Markerpeptiden

Im nächsten Schritt wurden spezifische Markerpeptide zu den identifizierten Kristalloproteinen ausgewählt. Für die qualitativen Markerpeptide, um die Subspezies unterscheiden zu können, war das wichtigste Kriterium die Selektivität. Die Überprüfung erfolgte mittels einer UniProtKB BLAST Analyse, die unter Verwendung der SwissProt Datenbank in silico durchgeführt wurde. Ein weiteres wesentliches Kriterium war die Intensität sowie die Sequenzlänge, um eine optimale Ionisation und ein möglichst intensives Messsignal zu erhalten. Für die Quantifizierung der Markerpeptide wurden, sofern verfügbar, Sequenzen ausgewählt, die in einer Vielzahl unterschiedlicher Kristalltoxine vorkommen, um eine möglichst umfassende Quantifizierung zu gewährleisten. Die in Tabelle 7 präsentierte Übersicht umfasst die gewählten Peptide.

Tabelle 7: Übersicht der identifizierten qualitativen und quantitativen Markerpeptide

Bt Subspezies	Protein	UniProt ID	Peptidsequenz	Vorläuferion m/z	Übergang m/z Peptid	SIL
Israelensis	Cry11Aa	P21256	TEVETLINQK	587.8193 ++	389.2143	397.2304
			TEVETLINQK(13C6,15N2)	591.8505 ++	716.4301	724.4568
					502.2984	510.3184
					615.3824	623.4030
					845.4727	853.4966
Israelensis	Cry11Aa	P21256	TQTFYQNPNNEPIAPR	945.4607 ++	1007.5269	
					1121.5698	
					1249.6284	
					1412.6917	
					1559.7601	
Israelensis	Cry4Aa	P16480	TVDVFPDTDR	582.7802 ++	603.2733	613.2898
	Cry4Ba	P05519	TVDVFPDTDR(13C6,15N4)	587,8035 ++	391.1936	401.1936

Bt Subspezies	Protein	UniProt ID	Peptidsequenz	Vorläuferion m/z	Übergang m/z Peptid	SIL
					964.4371	974.4537
					750.3417	760.3622
					849.4101	859.4312
Israelensis	Cry4Aa	P16480	ISSPDGYASLDNLEVIEEGPIDGEALSR	982.8120 +++	1014.5215	
	Cry4Ba	P05519			632.3362	
					957.5000	
					747.3632	
					1143.5640	
Kurstaki	Cry1Ac	P05068	NLLQDSNFK	539.7800 ++	495.2562	
					610.2831	
					851.4258	
					738.3417	
					408.2241	
Kurstaki	Cry2Aa	P0A377	GNSNYFPDYFIR	746.8464 ++	957.4841	967.5115
			GNSNYFPDYFIR(13C6,15N4)	751.8545 ++	810.4145	820.4227
					598.3356	608.511
					1120.5487	1130.5704
					1234.5946	1244.5974
Aizawai	Cry1Ca	P0A376	DLEYFPETDK	628.7877 ++	589.2828	
					736.3512	
					363.1874	
					1028.4571	
					899.4145	
Aizawai	Cry1Da	P19415	ETLQLETTIVYK	719.3954 ++	853.4666	
					966.5506	
					724.4240	
					623.3898	
					1094.615	
Kurstaki	Cry1Aa	P0A367	ELEYFPETDK	635.7955 ++	589.2828	597.2970
Aizawai			ELEYFPETDK(13C6,15N2)	639.8171 ++	736.3512	744.3654
					363.1874	371.2016
					899.4145	907.4287
					1028.4571	1036.4713
Internal Standard	Myoglobin Pferde	P68082	VEADIAGHGQEVLIR	536.2898 ++	814.4781	
					1008.5585	
					1079.5956	
					500.3555	
					757.4567	

Um eine absolute Quantifizierung zu ermöglichen, wurden für die quantitativen Markerpeptide stabil-isotopenmarkierte Standards (SIL) verwendet. Diese weisen eine identische Peptidsequenz wie die Markerpeptide auf, sind jedoch an den Aminosäuren Lysin (K) oder Arginin (R) mit den stabilen Isotopen 13C oder 15N markiert, sodass eine Unterscheidung anhand des unterschiedlichen Masse-zu-Landungsverhältnisses möglich ist. Als interner Standard wurde Myoglobin Protein vom Pferd gewählt, um die Effizienz des enzymatischen Verdaus zu überprüfen.

5.3.4 Methodenerstellung und Optimierung

Im letzten Schritt erfolgte die Erstellung und Optimierung die targeted Parallel Reaction Monitoring (PRM)-Methode unter Zuhilfenahme der Software Skyline (Version 24.1.0.199) und MassLynx (Version 4.2). Für alle 14 Peptide der PRM-Methode wurde die Kollisionsenergien optimiert. Zusätzlich wurde das Target-Enhancement für die quantitativen Markerpeptide, sowie den internen Standard optimiert. Die optimierten Werte für sämtliche Peptide werden in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Optimierte Kollisionsenergien und Target Enhancement für die Markerpeptide der PRM-Methode

Peptidsequenz	Kollisionsenergie [eV]	m/z Target Enhancement
TEVETLINQK	21,4 – 28,1	720
TEVETLINQK(13C6,15N2)		724
TVDVFPDTDR	21,2 – 27,9	970
TVDVFPDTDR(13C6,15N4)		974
ISSPDGYASLDNLEVIEEGPIDGEALSR	32,7 - 42	-
NLLQDSNFK	20 – 26,4	-
GNSNYFPDYFIR	25,9 – 33,7	960
GNSNYFPDYFIR(13C6,15N4)		965
DLEYFPETDK	22,6 – 29,5	-
ETLQLETTIVYK	25,1 – 32,7	-
ELEYFPETDK	22,8 – 29,8	740
ELEYFPETDK(13C6,15N2)		744
VEADIAGHGQEVLIR	19,9 – 26,3	1085

5.3.5 Validierung

5.3.5.1 Kalibration

Die Kalibration wurde im Konzentrationsbereich von 3,35 fmol/ µl – 42950 fmol/µl für alle vier quantitativen Peptidmarker mit mindestens fünf Kalibrationspunkten durchgeführt. Das Konzentrationslevel für die SIL-Peptide wurde so gewählt, dass eine optimale Detektion möglich war. Für die Auswertung und Erstellung der Kalibrationsgeraden wurde das Verhältnis der Peakflächen des Peptidmarkers zur Peakfläche des entsprechenden SIL-Peptids gegen die Konzentration in fmol, unter der Verwendung von Skyline, aufgetragen. Die Kalibration wurde im Duplikat vorgenommen, wobei die Ergebnisse in AbbildungenAbbildung 300-33 dargestellt sind.

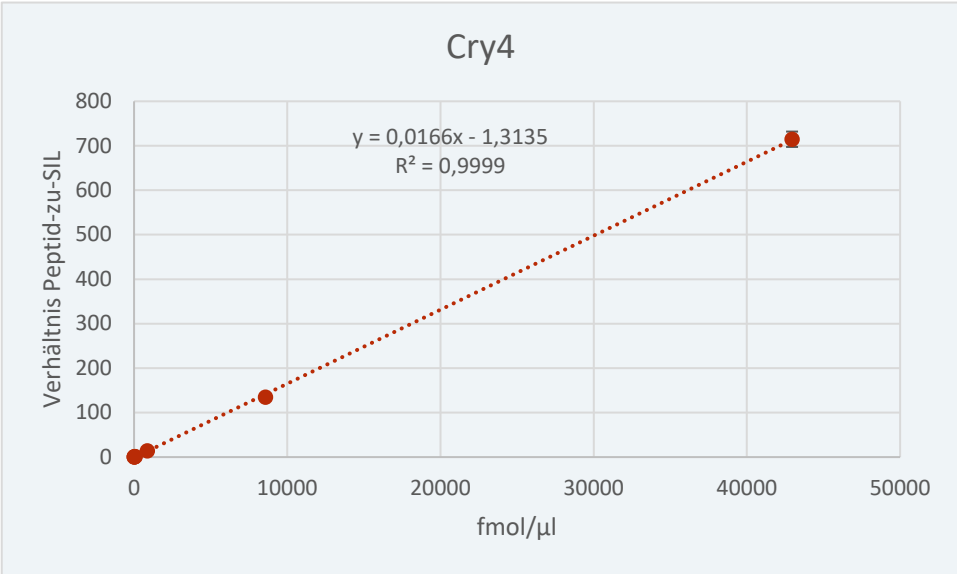

Abbildung 30: Kalibrationsgerade für Kristallprotein Cry4.

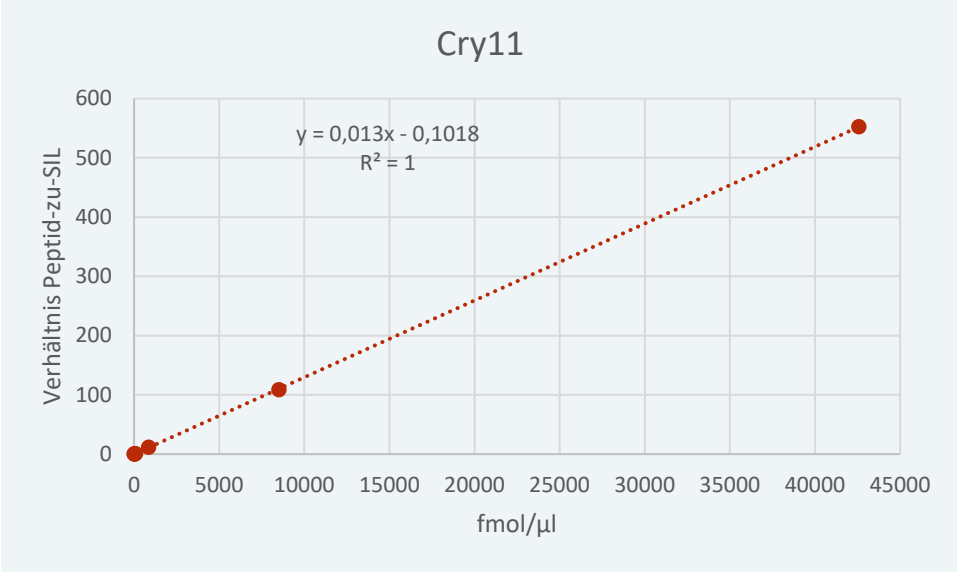
Cry11
y = 0,013x - 0,1018
R² = 1
Verhältnis Peptid-zu-SIL
600
500
400
300
200
100
0
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
35000
40000
45000
fmol/µl

Abbildung 31: Kalibrationsgerade für Kristallprotein Cry11

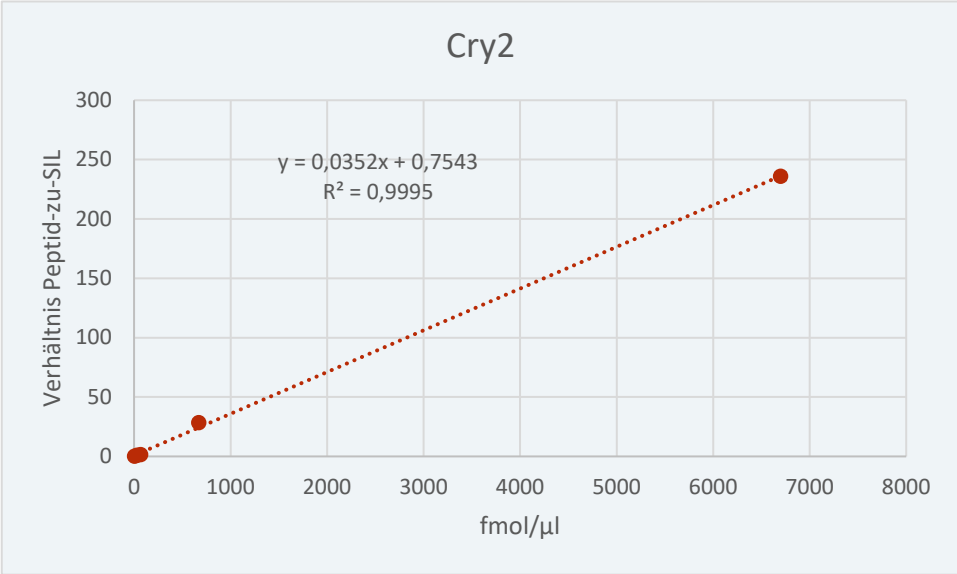

Abbildung 32: Kalibrationsgerade für Kristallprotein Cry2

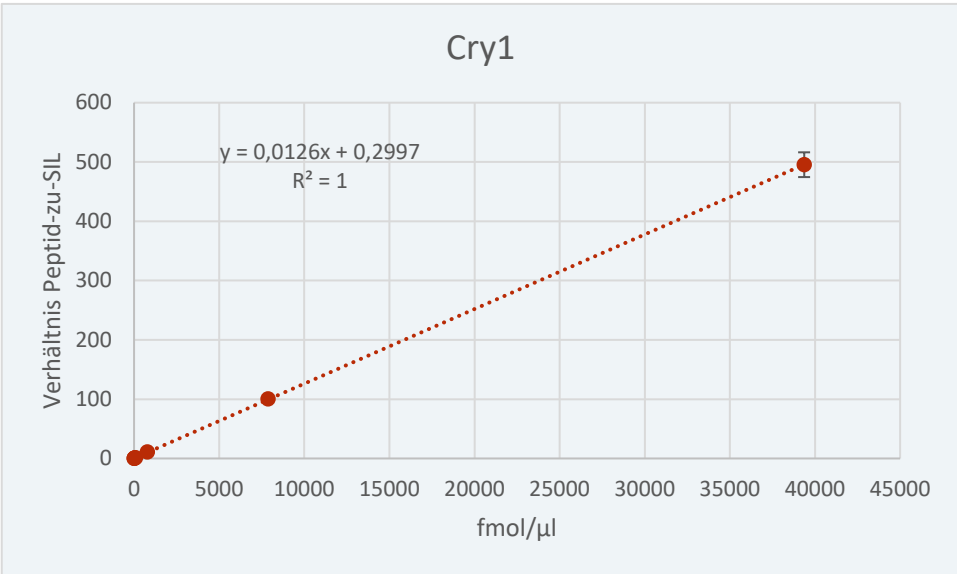

Abbildung 33: Kalibrationsgerade für Kristallprotein Cry1

5.3.5.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden auf Basis der Kalibrationen berechnet und im Anschluss durch Spikeexperimente praktisch überprüft. Die Werte für alle vier Markerpeptide sind in Tabelle 9 dargestellt. Die berechneten Werte zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den experimentell überprüften Werten.

Tabelle 9: Übersicht der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die quantitativen Markerpeptide

Peptidsequenz	Nachweisgrenze [ng/g]	Bestimmungsgrenze [ng/g]
TVDVFPDTDR	0,57	1,88
TEVETLINQK	0,89	2,70
GNSNYFPDYFIR	10,41	34,36
ELEYFPETDK	0,17	0,65

5.3.5.3 Selektivität

Die Selektivität der Markerpeptide wurde experimentell mit unterschiedlichen Bt Subspezies und ähnlichen Mikroorgansimen überprüft. Die Mikroorgansimen wurden von Leibnitz Institute DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH als getrocknete Zellkulturen erworben und mittels einer optimierten Probenvorbereitung, sowie der entwickelten PRM-Methode analysiert. Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse für die untersuchten Materialien.

Tabelle 10: Übersicht der Ergebnisse für die experimentelle Überprüfung der Selektivität; + Kristallprotein in der Probe identifiziert; - Kristallprotein in der Probe nicht identifiziert

Probenmaterial	Cry1Aa	Cry1Ab	Cry1Ac	Cry1Ca	Cry1Da	Cry2Aa	Cry2Ab	Cry4Aa/Ba	Cry11Aa
DSM 5725 – Bt spp. Kurstaki	+	+	+	-	-	+	+	-	-
DSM 5724 – Bt spp. Israelensis	-	-	-	-	-	-	-	+	+
DSM 6099 – Bt spp. Israelensis	-	-	-	-	-	-	-	+	+
DSM 6070 –	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Probenmaterial	Cry1Aa	Cry1Ab	Cry1Ac	Cry1Ca	Cry1Da	Cry2Aa	Cry2Ab	Cry4Aa/Ba	Cry11Aa
Bt spp. Kumamotoensis									
DSM 6110 – Bt spp. galleriae	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DSM 12001 – B. mycoides	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Die Ergebnisse zeigen sehr gute Selektivität für alle Markerpeptide, für alle Probenmaterialien stimmen die erwarteten mit den tatsächlichen Ergebnissen überein.

5.3.6 Anwendung der PRM-Methode

Im Rahmen der Evaluierung der Anwendbarkeit der Methode unter realen Bedingungen wurden Basilikum-, Petersilie-, Liebstöckel- und Minze-Pflanzen mit vier unterschiedlichen, kommerziell erhältlichen Bt-Produkten nach Angaben des Herstellers behandelt und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zu sehen.

Tabelle 11: Übersicht der identifizierten Kristallproteine der vier Bt-Präparate LepinoxPlus (Bts pp. Kurstaki EG-2348), Solabiol Zünsler und Raupenfrei (Bt spp. Kurstaki ABTS-351), Xentari (Bt spp. Aizawai ABTS-1857) und VectoBac (Bt spp. Israelensis AM65-52) nach Anwendung auf Basilikum, Petersilie, Liebstöckel und Minze.

Bt-Produkt	Probenmatrix	Cry1Aa	Cry1Ab	Cry1Ac	Cry1Ca	Cry1Da	Cry2Aa	Cry2Ab	Cry4Aa/Ba	Cry11Aa
LepinoxPlus	Basilikum	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	Petersilie	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	Liebstöckel	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	Minze	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Solabiol Zünsler- und Raupenfrei	Basilikum	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	Petersilie	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	Liebstöckel	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	Minze	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Xentari	Basilikum	+	+	-	+	+	-	-	-	-

Bt-Produkt	Probenmatrix	Cry1Aa	Cry1Ab	Cry1Ac	Cry1Ca	Cry1Da	Cry2Aa	Cry2Ab	Cry4Aa/Ba	Cry11Aa
	Petersilie	+	+	-	+	+	-	-	-	-
	Liebstöckel	+	+	-	+	+	-	-	-	-
	Minze	+	+	-	+	+	-	-	-	-
VectoBac Bt spp. Israelensis (AM65-52)	Basilikum	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	Petersilie	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	Liebstöckel	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	Minze	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Die unterschiedlichen Probenmatrices haben keinen Einfluss auf das Profil der Kristallproteine.

Zur absoluten Quantifizierung der Kristallproteine, wurden die vier Bt-haltigen Produkte erneut auf je zwei Basilikum-Pflanzen, nach Angaben des Herstellers, aufgetragen. Tabelle 12 zeigt eine Übersicht er Ergebnisse.

Tabelle 12: Absolute Kristallprotein-Gehalte in ng/g Probe nach Anwendung der vier Bt-Präparate auf Basilikum

Bt-Produkt	Cry1Aa/Ab/Ac [ng/g]	Cry2Aa/Ab [ng/g]	Cry4Aa/Ba [ng/g]	Cry11Aa [ng/g]
LepinoxPlus Bt spp. Kurstaki (EG-2348	0,90 ± 0,037	< LOD	< LOD	< LOD
Solabiol Zünsler- und Raupenfrei Bt spp. Kurstaki (ABTS-351)	3,05 ± 0,015	< LOD	< LOD	< LOD
Xentari Bt spp. Aizawai (ABTS-1857)	0,50 ± 0,007	< LOD	< LOD	< LOD
VectoBac Bt spp. Israelensis (AM65-52)	< LOD	< LOD	1,19 ± 0,035	0,12 ± 0,0003

Bei B. thuringiensis ssp.israelensis dominiert die Expression der Cry4-Proteine. In Bezug auf B. thuringiensis ssp. kurstaki wurde sowohl bei Stamm EG-2348 als auch bei Stamm ABTS-351 eine höhere Menge an Cry1-Proteinen im Vergleich zu Cry2-Proteinen festgestellt. Die Menge an Cry2-Proteinen liegt bei beiden Stämmen unterhalb der Nachweisgrenze. Es konnte festgestellt werden, dass beide Stämme der B. thuringiensis ssp. kurstaki eine höhere Produktion von Cry1-Proteinen aufweisen als B. thuringiensis ssp. aizawai. Es wurde ersichtlich, dass es einen deutlichen Unterschied in der Menge der gebildeten Cry1-Proteine zwischen den beiden Stämmen der B. thuringiensis ssp. kurstaki gibt.

Der Stamm ABTS-351 produziert deutlich mehr Kristalltoxin als EG-2348. Gemäß den Herstellerangaben sind in beiden Produkten ähnliche Anteile an der Bt-Subspezies enthalten (EG-2348: 37,5 % (w/w); ABTS-351 33,2 % (w/w)). Dieser Unterschied lässt sich demnach auf die unterschiedliche Zusammensetzung der enthaltenen Stämme zurückführen.

6 Diskussion

Der Nachweis von präsumtiven Bacillus cereus (pBC) gemäß dem ISO-Referenzverfahren auf MYP-Agar ist für Rohstoffe sowie für verarbeitete Gemüse- und Salatprodukte mit einer hohen natürlichen Hintergrundflora nur bedingt geeignet (ISO 7932). Da diese Proben oft deutlich höhere Gesamtkeimzahlen aufweisen als stärker prozessierte Lebensmittel, führt das Verfahren zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen. Eine Differenzierung zwischen Biopestizid-stämmigen Bacillus-thuringiensis-Isolaten (z. B. Bt subsp. kurstaki, Bt subsp. aizawai) und pathogenen B. cereus-Stämmen, die mit emetischen (Cereulid-bildenden) oder enterotoxischen (Enterotoxin-bildenden) Lebensmittelvergiftungen assoziiert sind, ist nicht möglich. In der modernen Risikobewertung muss diese Unterscheidung jedoch zwingend berücksichtigt werden – ein Ansatz, der auch von der EFSA (2025) in ihrer aktuellen Biohaz Opinion für jedes Biopestizid explizit gefordert wird. Selektive Nährmedien wie MYP-Agar reichen hierfür nicht aus. Stattdessen sind molekularbiologische Methoden (z. B. qPCR zum Nachweis spezifischer Toxingene wie ces oder nhe) und Whole Genome Sequencing erforderlich, um eine zielgerichtete Risikoeinschätzung zu ermöglichen. Das Ziel dieser Studie bestand darin, einen mikro- und molekularbiologischen Diagnostik-Workflow zu entwickeln, der Primärproduzenten dabei unterstützt,

– die korrekte Dosierung von Biopestiziden (z. B. Bacillus thuringiensis-Stämme) zu überprüfen und

– sicherzustellen, dass die in der Sekundärproduktion geltenden Grenzwerte (z. B. für die B. cereus-Gruppe) nicht überschritten werden. Mithilfe der Kombination kulturbasierter Nachweismethoden (modifizierter chromogener Agar) und spezifischer molekularer Analysen (z. B. Toxin Profil, panC, RAPD, MLST, cry2- oder ces-Gen PCR) soll eine zuverlässige Unterscheidung zwischen applizierten Biopestizid-Stämmen und potenziell pathogenen Kontaminationen ermöglicht werden. Dies ist eine Voraussetzung für die Einhaltung regulatorischer Vorgaben und die Sicherheit der Lebensmittelkette.

In unserer Studie haben wir einen schnellen und praxistauglichen Diagnostik-Workflow etabliert. Dieser steht nun für die Routinekontrolle von Biopestiziden sowie für die Eigenkontrolle in der Sekundärproduktion zur Verfügung.

Das optimierte Protokoll umfasst die mikrobiologische Quantifizierung auf Chromoselect Bacillus Agar (modifiziert mit Eigelb und Selektivsupplementen) zur selektiven Anreicherung und Differenzierung von Bacillus-Spezies. Außerdem die ces PCR typischer Kolonien, um emetische B. cereus-Stämme auszuschließen. Diese sind in der Kategorie Gemüse, Kräuter und Salate zwar selten, spielen jedoch in stärkehaltigen Produkten (inklusiven Convenience-Lebensmitteln) eine erhebliche Rolle. Im nächsten Schritt wird eine cry2-spezifische PCR durchgeführt, die Hinweise auf die Anwesenheit der Biopestizid-Stämme Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki und aizawai liefert. Anhand der positiven Proben kann anschließend eine schnelle RAPD-PCR durchgeführt werden, um einen genetischen Stammabgleich vorzunehmen und die Identität der Isolate zu bestätigen. Dieser Ansatz ermöglicht eine zielgerichtete und effiziente Überprüfung der applizierten Biopestizid-Stämme.

In unserer Studie haben wir einen flexiblen und erweiterbaren Diagnostik-Workflow entwickelt, der nicht nur die grundlegende Quantifizierung präsumptiver Bacillus cereus-Gruppen (pBC) ermöglicht, sondern auch vertiefende Analysen für epidemiologische und ökologische Fragestellungen zulässt. Für eine detaillierte epidemiologische Untersuchung kann der Workflow um die Bestimmung des Enterotoxin-Profils erweitert werden, da die relevanten Biopestizid-Stämme Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki und aizawai dem Toxinprofil A zugeordnet werden und typischerweise die Sequenztypen ST8 oder ST15 aufweisen. Zur weiteren Aufklärung der genetischen Diversität und Anpassungsmechanismen dieser Stämme besteht die Möglichkeit, ausgewählte Isolate mittels ONT-Sequenzierung (Oxford Nanopore Technologies) zu analysieren. Dies erlaubt Rückschlüsse auf Evolution und Nischenanpassung.

Zusätzlich ist es von Bedeutung, Pflanzenpathogene und Verderbserreger zu identifizieren, die entwederkulturbasiert durch 16S-Sequenzierung oder MALDI-Biotyping charakterisiert und anschließend einer Risikoanalyse unterzogen werden können. Um ein umfassendes Verständnis der mikrobiellen Gemeinschaft zu erlangen, kann das gesamte Mikrobiom durch Illumina MiSeq-Sequenzierung untersucht werden. Dies ermöglicht auch die Erfassung nicht kultivierbarer Mikroorganismen. Abschließend bietet die gleiche DNA-Grundlage die Option, quantitative Real-Time-PCR-Analysen (z. B. für das cry2- oder ces-Gen) durchzuführen, um spezifische Zielgene präzise zu quantifizieren.

Dieser mehrstufige Ansatz verbindet praktische Anwendbarkeit mit wissenschaftlicher Tiefe und unterstützt sowohl die Qualitätskontrolle in der Lebensmittelproduktion als auch grundlegende Forschungsfragen.

Im Rahmen des Projektes konnte außerdem ein LC-MS/MS-Verfahren etabliert werden, welches eine qualitative und quantitative Bestimmung von Bt-Kristallproteinen ermöglicht. Für die drei Bt-Subspezies Kurstaki, Aizawai und Israelensis wurden jeweils ein bis zwei spezifische Markerpeptide identifiziert, die eine eindeutige qualitative Unterscheidung ermöglichen. Die Selektivität der gewählten Peptide wurde sowohl in silico mittels BLAST-Analyse als auch experimentell überprüft.Für alle Markerpeptide konnten sehr gute Ergebnisse verzeichnet werden. Zur absoluten Quantifizierung der Kristallproteinmenge wurden „shared“ Peptidsequenzen gewählt, um eine möglichst breite Erfassung verschiedener Kristallproteine zu ermöglichen. Für die vier gewählten quantitativen Peptidmarkern kamen jeweils die stabil-isotopenmarkierte Standards (SIL) zum Einsatz. Die Probenvorbereitung wurde hinsichtlich Extraktionsmittel und Anreicherungsstrategie und die entwickelte targeted LC-MS/MS-PRM-Methode hinsichtlich Kollisionsenergie und Target Enhancement optimiert. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methode liegen für alle quantitativen Peptidmarker im unteren ng/g-Bereich, was einer Konzentration im ppb-Bereich entspricht. Die Methode wurde erfolgreich auf verschiedene kommerziell erhältliche Bt-Produkte sowie auf realen Proben angewendet, um die Praxistauglichkeit zu evaluieren. Es konnten keine signifikanten qualitativen Unterschiede im Proteinprofil auf Stammebene festgestellt werden. Hingegen wurden deutliche quantitative Unterschiede beobachtet, die von der von der Subspezies und dem Stamm abhängig waren. Die Ergebnisse demonstrieren die erfolgreiche Konzeption einer hochsensitiven und selektiven targeted LC-MS/MS Methode, die sowohl den qualitativen als auch den quantitativen Nachweis von Bt-Kristalltoxinen in Bt-haltigen Produkten und Lebensmittelproben ermöglicht.

Unsere Studie zeigt zudem, dass Hersteller im Rahmen der Eigenkontrolle nur 60 % der Proben korrekt als präsumptive Bacillus cereus (pBC) identifizieren. Die häufigen falsch-positiven Befunde sind vor allem auf die dominante Begleitflora in frischen Gemüse- und Salatprodukten zurückzuführen, die eine zuverlässige Detektion deutlich erschwert. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, spezifischere Nachweismethoden einzusetzen und die mikrobiologische Überwachung auf ein breiteres Spektrum an relevanten Mikroorganismen auszuweiten.

In dieser Studie zeigen die Daten eindeutig, dass in der Primärproduktion ausschließlich Bacillus thuringiensis (Bt)-Stämme nachweisbar sind, die durch einen Verdrängungseffekt das Vorkommen anderer präsumptiver Bacillus cereus (pBC)-Stämme unterdrücken. In der Sekundärproduktion bleiben diese Bt-Stämme zwar weiterhin nachweisbar, überschreiten jedoch selten die festgelegten Grenzwerte. Angesichts der jüngsten Rückrufe und Ausbrüche durch Salmonellen und Listeria monocytogenes sollte jedoch verstärkt Aufmerksamkeit auf andere Vertreter der Produktflora gerichtet werden (https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search; https://www.foodsafetynews.com/). Besonders relevant sind dabei Pflanzenpathogene und Verderbserreger, die während der weiteren Verarbeitung eine entscheidende Rolle spielen, wie Hefen, Schimmelpilze, Pseudomonas-Arten, Enterobakterien und Milchsäurebakterien.

In der Sekundärproduktion führt die Zugabe weiterer Rohstoffe zu einer erhöhten Diversität an Bacillus cereus-Stämmen, die vor allem den panC-Gruppen II, III, IV und V zugeordnet werden können. Interessanterweise bildeten diese Stämme in der Studie keine emetischen Toxine. Besonders auffällig war jedoch das vermehrte Auftreten von ST26, einem persistenten B. cereus-Sequenztyp, der sich in den untersuchten Betrieben breiter verbreitete und damit eine besonders stabile Besiedlung der Produktionsumgebung zeigte. Im Gegensatz dazu konnten andere Sequenztypen keine vergleichbare Persistenz aufweisen, was auf spezifische Anpassungsmechanismen oder Resistenzfähigkeiten von ST26 hindeutet. Dies unterstreicht die Bedeutung einer gezielten Überwachung dieses Klons, um mögliche Risiken für die Lebensmittelsicherheit frühzeitig zu erkennen und zu kontrollieren.

Zusätzlich traten in der Analyse der Pflanzenpathogene und Hygieneindikatoren deutlich pflanzenpathogene Bakterien hervor, die insbesondere bei Salaten und Gemüse zu Ernteausfällen führen können. Dazu zählen Arten wie Chryseobacterium, Pantoea, Erwinia, Shewanella, Serratia, Pseudomonas, Xanthomonas, Clavibacter, Sphingobacterium, Glutamicibacter und Pectobacterium. Außerdem wurden Hygieneindikatoren (z.B. Pseudomonas Arten, Pantoea, Serratia, Enterococcus, Milchsäurebakterien, Hefen und Schimmelpilze) identifiziert, die mit einer verkürzten Haltbarkeit der Rohstoffe und der daraus hergestellten Erzeugnisse assoziiert sind. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer gezielten mikrobiologischen Überwachung entlang der gesamten Produktionskette, um sowohl pflanzenpathogene Risiken als auch Qualitätsverluste zu minimieren.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risikobewertung der Keimgruppen (bakterielle Phyla)..... 37
Tabelle 2: Keime mit Protein- und Fettabbau-Potenzial..... 37
Tabelle 3: Risikobewertung der hoch abundanten Bakterien..... 41
Tabelle 4: Empfohlene Maßnahmen für Salat und Gemüse um die Produktsicherheit und -qualität zu gewährleisten. 42
Tabelle 5: Sequenztypen die häufig bei Lebensmittelintoxikation mit Erbrechen auftreten. 47
Tabelle 6: Übersicht der identifizierten Kristallproteine in den analysierten Bt-Präparaten 53
Tabelle 7: Übersicht der identifizierten qualitativen und quantitativen Markerpeptide.... 54
Tabelle 8: Optimierte Kollisionsenergien und Target Enhancement für die Markerpeptide der PRM-Methode..... 56
Tabelle 9: Übersicht der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die quantitativen Markerpeptide..... 60
Tabelle 10: Übersicht der Ergebnisse für die experimentelle Überprüfung der Selektivität; + Kristallprotein in der Probe identifiziert; - Kristallprotein in der Probe nicht identifiziert60
Tabelle 11: Übersicht der identifizierten Kristallproteine der vier Bt-Präparate LepinoxPlus (Bts pp. Kurstaki EG-2348), Solabiol Zünsler und Raupenfrei (Bt spp. Kurstaki ABTS-351), Xentari (Bt spp. Aizawai ABTS-1857) und VectoBac (Bt spp. Israelensis AM65-52) nach Anwendung auf Basilikum, Petersilie, Liebstöckel und Minze..... 61
Tabelle 12: Absolute Kristallprotein-Gehalte in ng/g Probe nach Anwendung der vier Bt-Präparate auf Basilikum 62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick der in Österreich zugelassenen Bacillus Biopestizide (https://www.baes.gv.at/zulassung/pflanzenschutzmittel/pflanzenschutzmittelregister; https://www.raiffeisen.com/pflanzenschutzmittel/liste)..... 10
Abbildung 2: pBC Isolat Charakterisierung wie in der ISO 7932 Amendment 2020 vorgesehen. 13
Abbildung 3: Darstellung der Projektziele innerhalb des Projekts. 14
Abbildung 4: Drei Gründe für Die Entwicklung sensitiver Nachweis- und Typisierungsmethoden für pBc und Bt..... 15
Abbildung 5: Ein alternativer Analyse Workflow für Bacillus cereus präsumtiv und die molekularbiologische Charakterisierung wird dargestellt. 18
Abbildung 6: Kultur- und nicht Kultur basierter Analyse Workflow zur Bestimmung der Mikrobiota und Quantifizierung des cry Gens im Gemüse. 19
Abbildung 7: Proteomics-Workflow für Etablierung einer targeted Methode zur Analyse von Kristall-Toxinen mittels hochauflösender LC-MS/MS 21
Abbildung 8: Molekularbiologische Charakterisierung zur Differenzierung von pBC und BT mit Sequenziermethoden und Toxin-Profiling. 22
Abbildung 9: Differenzierung von pBC und BT mit der cyr2 PCR anhand eines pBC Isolatset zweier Hersteller. 23
Abbildung 10: Differenzierung von pBC und BT mit der panC PCR und dem Toxin Profiling anhand eines pBC Isolatset zweier Hersteller. 24
Abbildung 11: pBC Isolat Test Panel für die Methodenbewertung (n=57). 25
Abbildung 12: Beispielbild für eine RAPD PCR von pBC Isolaten. Das dominanten RAPD Profil ist links im Bild B. thuringiensis subsp. aizawai. 27
Abbildung 13: Mikrobiologische Parameter (Gesamtkeimzahl, pBC, pBC Begleitflora; log KbE/g) der LGV Feldproben im zeitlichen Verlauf. 28
Abbildung 14: Mikrobiologische Parameter (Gesamtkeimzahl, pBC, pBC Begleitflora, log KbE/g) der Handelsproben (Retail) im zeitlichen Verlauf. 29
Abbildung 15: MALDI-Biotyping Bestätigung von pBC im Rahmen der Eigenkontrolle. 30
Abbildung 16: Bakterielle Spezies Diversität in den 4 dominierenden Phyla bei Isolaten aus Salat und Gemüse..... 32
Abbildung 17: Bakterielle Spezies des Phylums Actinomycetota – Isolierung, Nischenzuordnung und Risikobewertung. 32
Abbildung 18: Bakterielle Spezies des Phylums Bacteriodota – Isolierung, Nischenzuordnung und Risikobewertung. 33

Abbildung 19: Bakterielle Spezies des Phylums Bacillota – Isolierung, Nischenzuordnung und Risikobewertung..... 34
Abbildung 20: Bakterielle Spezies des Phylums Pseudomonadota (Teil 1) – Isolierung, Nischenzuordnung und Risikobewertung. 35
Abbildung 21: Bakterielle Spezies des Phylums Pseudomonadota (Teil 2) – Isolierung, Nischenzuordnung und Risikobewertung. 36
Abbildung 22: Häufige Isolate mit Relevanz für Verderb oder Pflanzenpathogenität zugeordnet zu den einzelnen Salaten und Gemüse (Daten Feld- und Handelsproben)..... 40
Abbildung 23: Bacillus thuringiensis Isolate aus der Feldstudie mit Ihren genetischen Charakteristika..... 43
Abbildung 24: Bacillus cereus und B. thuringiensis Isolate aus der Feldstudie mit Handelsproben mit Ihren genetischen Charakteristika. 44
Abbildung 25: Bacillus cereus, B. mycoides und B. thuringiensis Isolate von Proben des Sekundärproduzenten mit Ihren genetischen Charakteristika. 45
Abbildung 26: Erste Mikrobiomanalyse- Krona Darstellung aus Salatproben (n=21). 48
Abbildung 27: Mikrobiomanalyse- Krona Darstellung aus Salat- und Gemüseproben (n=25). 49
Abbildung 28: Quantitative Real-Time-PCR (qPCR) des Target Gens cry 2 modifiziert nach Wei et al. (2019). 50
Abbildung 29: Lösliche Proteine von Bt-Präparaten nach der Extraktion mit Harnstoff (Urea) und Ammoniumbicarbonat (AMBIC), aufgereinigt mit Size Exclusion Säulen (SEC), Ultrafiltration (UF) 5 kDa und 10 kDa; *p-Werte unter 0.05 zeigen signifikante Unterschiede 52
Abbildung 30: Kalibrationsgerade für Kristallprotein Cry4. 57
Abbildung 31: Kalibrationsgerade für Kristallprotein Cry11 59
Abbildung 32: Kalibrationsgerade für Kristallprotein Cry2 59
Abbildung 33: Kalibrationsgerade für Kristallprotein Cry1 59

Literaturverzeichnis

Abbey, L., Amoako-Attah, I., Tabi, M. T., & de Maagd, R. A. (2024). Bacillus thuringiensis (Bt)-based biopesticide: Navigating success, challenges, and future horizons in sustainable pest control. International Journal of Biological Macromolecules. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130123

AGES – Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit. (2023). Zugelassene Pflanzenschutzmittel im Biolandbau. https://www.ages.at/themen/pflanzenschutzmittel/zulassung/pflanzenschutzmittel-im-biolandbau/

Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology (5. Aufl.). Elsevier Academic Press.

Bottone, E. J. (2010). Bacillus cereus: A review of its clinical significance. Journal of Clinical Microbiology, 48(11), 3863–3870. https://doi.org/10.1128/JCM.00724-10

Braun, P., & Lydon, J. (2019). Bacillus thuringiensis and its applications in agriculture. Journal of Applied Microbiology, 126(1), 1–10. https://doi.org/10.1111/jam.14115

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA). (2023). TRBA 466: Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen. GMBl, 2023(16–24), 330. https://www.baua.de/DE/Angebote/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html

Biggel, M., Jessberger, N., Kovac, J., & Johler, S. (2022). Recent paradigm shifts in the perception of the role of Bacillus thuringiensis in foodborne disease. Food microbiology, 105, 104025.

Bio Austria. (2021). Richtlinien für den biologischen Gemüseanbau: Schädlingsmanagement mit Bacillus thuringiensis. https://www.bio-austria.at/richtlinien/

Bonis, M., Felten, A., Pairaud, S., Dijoux, A., Maladen, V., Mallet, L., ... & Herbin, S. (2021). Comparative phenotypic, genotypic and genomic analyses of Bacillus thuringiensis associated with foodborne outbreaks in France. PloS one, 16(2), e0246885.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.

Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon, 57 (4), 421–435. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.12.011

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). (2020). Bacillus cereus-Bakterien in Lebensmitteln können Magen-Darm-Erkrankungen verursachen. https://www.bfr.bund.de/lebensmittel-und-futtermittelsicherheit/bewertung-mikrobieller-risiken-von-lebensmitteln/gesundheitliche-bewertung-von-bakterien/bacillus-cereus/

Carroll, L. M. et al. (2020). Genomic insights into the Bacillus cereus group: Implications for food safety. Frontiers in Microbiology, 11, 1234.

Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). (2021). Richt- und Warnwerte für mikrobiologische Parameter in Lebensmitteln. https://www.dghm-richt-warnwerte.de/

Ehling-Schulz, M. et al. (2019). Bacillus cereus group populations: Ecology and molecular detection. Frontiers in Microbiology, 10, 935.

European Food Safety Authority (EFSA). (2016). Scientific Opinion on Bacillus cereus and other Bacillus spp. in foodstuffs. EFSA Journal, 14(12), 4524. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524

European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., … Herman, L. (2025). Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 21: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2024. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2025.9169

EU-Richtlinie 2000/54/EG: Europäisches Parlament & Rat der Europäischen Union. (2000). Richtlinie 2000/54/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. September

2000 über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, L 262/21. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX%3A32000L0054

Europäische Kommission. (2005). Verordnung (EG) Nr. 396/2005 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Februar 2005 über Höchstgehalte an Pestizidrückständen in oder auf Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen und tierischen Ursprungs und zur Änderung der Richtlinie 91/414/EWG des Rates. Amtsblatt der Europäischen Union, L 70, 1–16. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX%3A32005R0396

Fuchs, E., Raab, C., Brugger, K., Ehling-Schulz, M., Wagner, M., & Stessl, B. (2022). Performance testing of Bacillus cereus chromogenic agar media for improved detection in milk and other food samples. Foods, 11(3), 288.

Geisslitz, S., Islam, S., Buck, L., Grunwald-Gruber, C., Sestili, F., Camerlengo, F., ... & D'Amico, S. (2022). Absolute and relative quantitation of amylase/trypsin-inhibitors by LC-MS/MS from wheat lines obtained by CRISPR-Cas9 and RNAi. Frontiers in plant science, 13, 974881.

Guinebretière, M. H., Velge, P., Couvert, O., Carlin, F., & Debuyser, M. L. (2010). The food poisoning power of Bacillus cereus Group strains varies 1 according to phylogenetic affiliation (groups I-VII), not to species affiliation. Journal of Clinical Microbiology, 48(9), 3388-3391.

Kaiser-Alexnat, R. (2012). Bacillus thuringiensis: Grundlagen und Einsatz im biologischen und integrierten Pflanzenschutz. epubli. https://orgprints.org/20753/1/Bacillus-thuringiensis-A5-epubli.pdf

International Organization for Standardization (ISO). (2004). ISO 7932:2004/Amd 1:2020 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus cereus — Colony-count technique at 30 degrees C. Amendment 1: Inclusion of optional tests.

International Organization for Standardization (ISO). (2013). ISO 4833-2:2013 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms Part 2: Colony count at 30 °C by the surface plating technique.

Landwirtschaftskammer Österreich (LWK Österreich). (2022). Integrierter Pflanzenschutz im Gemüsebau: Empfehlungen für die Praxis. https://www.lko.at

Österreichisches Parlament. (2006). Bundesgesetz über die Sicherheit der Lebensmittelkette und der Lebensmittel (Lebensmittelsicherheits- und Verbraucherschutzgesetz – LMSVG). BGBl. I Nr. 13/2006, zuletzt geändert durch BGBl. I Nr. 123/2021. https://www.ris.bka.gv.at/

Planque, M., Arnould, T., Dieu, M., Delahaut, P., Renard, P., & Gillard, N. (2016). Advances in ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for sensitive detection of several food allergens in complex and processed foodstuffs. Journal of Chromatography A, 1464, 115-123.

Raab, C. (2021). Bacillus cereus Gruppe: Präsenz und kultureller Nachweis in Lebensmitteln [Diplomarbeit, Veterinärmedizinische Universität Wien]. PHAIDRA. https://phaidra.vetmeduni.ac.at/o:1835

Raymond, B. (2021). Bacillus thuringiensis: Biology, ecology and safety. Wiley-Blackwell.

Şahin, B., Gomis-Cebolla, J., Güneş, H., & Ferre, J. (2018). Characterization of Bacillus thuringiensis isolates by their insecticidal activity and their production of Cry and Vip3 proteins. Plos one, 13(11), e0206813.

Sanahuja, G. et al. (2011). Bacillus thuringiensis: A century of research, development and commercial applications. Plant Biotechnology Journal, 9(3), 283–300.

Schneider, C. L. (2018). Plant Diseases and Their Management: A Comprehensive Guide (2. Aufl.). CABI.

Shiekh Suliman, N., Talaei-Hassanloui, R., Abachi, H., Zarei, S., & Osdaghi, E. (2025). Taxonomic refinement of Bacillus thuringiensis. Frontiers in Microbiology, 16, 1518307.

TRBA 466: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA). (2022). TRBA 466: Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen. https://www.baua.de/DE/Angebote/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf

Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (2013). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, 54(3), 134-139.

Wei, S., Chelliah, R., Park, B. J., Kim, S. H., Forghani, F., Cho, M. S., ... & Oh, D. H. (2019). Differentiation of Bacillus thuringiensis from Bacillus cereus group using a unique marker based on real-time PCR. Frontiers in microbiology, 10, 883.

Abkürzungen

Bt	Bacillus thuringiensis
ces	Cereulid-Synthetase Gen
cry	Kristalltoxin Gen
cytK	Zytotoxin Enterotoxin Gen
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DDA	Data-dependent acquisition
DIA	Data-independent acquisition
EFSA	European Food Safety Authority
GKZ	Gesamtkeimzahl
ISO	Internationale Organisation für Normung
hbl	Hämolysin BL Enterotoxin Gen
KbE	Kolonien bildenden Einheiten
LC-MS/MS	Flüssigkeits-Chromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie
MLST	Multi-Lokus Sequenztypisierung
MYP	Mannitol-Eigelb-Polymyxin
nhe	nicht-hämolytisches Enterotoxin Gen
panC	Pantoate-β-Alanin-Ligase
pBC	präsumptiv Bacillus cereus
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
SEC	Size-Exclusion Chromatography, Deutsch: Größenausschluss-Chromatographie
WGS	Gesamtgenomsequenzierung, Whole Genome Sequencing
UF	Ultra-Filtration